

Derivatives of soluble T-4.

Publication number: JP2503269T

Publication date: 1990-10-11

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: C12N15/09; A61K38/00; A61P31/12; C07K14/00; C07K14/725; C07K14/73; C07K16/28; C12N5/10; C12P21/02; C12R1/91; C12N15/09; A61K38/00; A61P31/00; C07K14/00; C07K14/435; C07K16/18; C12N5/10; C12P21/02; A61K38/00; (IPC1-7): A61K37/02; C07K13/00; C12N5/10; C12N15/48; C12P21/02

- european: C07K14/705B14; C07K16/28A14

Application number: JP19890503131 19890224

Priority number(s): US19880160348 19880224

Also published as:

EP0330227 (A2)
 WO8908143 (A1)
 EP0330227 (A3)
 PT89838 (B)
 HU213019 (B)

[more >>](#)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP2503269T

Abstract of corresponding document: **EP0330227**

This invention provides a therapeutic agent capable of specifically forming a complex with human immunodeficiency virus envelope glycoprotein which comprises a polypeptide. In one embodiment of the invention, the amino acid sequence of the polypeptide comprises the amino acid sequence shown in Figure 6 from about +3 to about +185 fused to the amino acid sequence from about +351 to about +369. In another embodiment of the invention, the amino acid sequence of the polypeptide comprises the amino acid sequence shown in Figure 6 from about +3 to about +106 fused to the amino acid sequence from about +351 to about +369. In yet a further embodiment of the invention, the amino acid sequence of the polypeptide comprises the amino acid sequence shown in Figure 6 from about +3 to about +185. This invention also provides a method for treating a subject infected with a human immunodeficiency virus. The method comprises administering to the subject an effective amount of a pharmaceutical composition comprising an effective amount of a therapeutic agent of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

②日本国特許庁(JP)

①特許出願公

②公表特許公報(A)

平2-5(

③Int.Cl.
C 12 P 21/02

識別記号

序内登録番号

C 8214-4B
8717-4B
8807-4B

審査請求 未請求
子備審査請求 未請求

部門(区分)
A
B※

(全)

④公表 平成2年(1990)

⑤発明の名称 可溶性T4の誘導体

⑥特 願 平1-503131

⑦出 願 平1(1989)2月24日

⑧翻訳文提出日 平1(1989)10月24日

⑨国際出願 PCT/US89/00762

⑩国際公開番号 WO89/08143

⑪国際公開日 平1(1989)9月8日

優先権主張 ⑫1988年2月24日米国(US)⑬160,348

⑭発明者 マダン、ポール・ジェイ

アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク、10032、ニュー・ヨーク、
ブン・アベニュー・00

⑮出願人 ザ・トラステイーズ・オブ・コ

アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク、10027、ニュー・ヨーク、
ロンピア・ユニヴァーシティ・スト・ワンハンドシード・アンド・シックスティーンス・ス
イン・ザ・シティ・オブ・ニューヨーク・アンド・ブロードウェイ (番地なし)

ー・ヨーク

⑯代理人 弁理士 川口 鑑造 外2名

⑰指定国 AU, DK, FI, HU, JP, KR, NO

最終頁に統く

抄書(内容に変更なし)

請求の範囲

四 請求項1, 2又は3のいずれかに記載のポリペクターを構成する発現ベクター。

- 1) 請求項6の発現ベクターから成る宿主細胞。
2) 請求項6の宿主細胞である請求項7の宿主細胞。
3) 大腸菌宿主細胞である請求項8の細胞壁疊層細胞。
4) 真核宿主細胞である請求項7の宿主細胞。
5) 咽孔類宿主細胞である請求項10の真核宿主細胞。
6) 酵母宿主細胞である請求項10の真核宿主細胞。
7) 黑虫宿主細胞である請求項7の宿主細胞。
8) 請求項6の発現ベクター系を過する条件で増殖させ、かくして得られた培養液を回収する
る請求項1, 2又は3のいずれかに記載の培養液。

(1) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ型タンパク質と特異的に結合可能な可溶性治療剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+18.3までが約+3.5から約+3.6.9までのアミノ酸配列に整合したものであることを特徴とする治療剤。

(2) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ型タンパク質と特異的に結合可能な可溶性治療剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+10.6までが約+3.5から約+3.6.9までのアミノ酸配列に整合したものであることを特徴とする治療剤。

(3) ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ型タンパク質と特異的に結合可能な可溶性治療剤であって、ポリペプチドから成り、そのアミノ酸配列は表6に示すアミノ酸配列の約+3から約+18.5までのものであることを特徴とする治療剤。

(4) 請求項1, 2又は3のいずれかに記載の治療剤の有用性と

特許(内容に変更なし)

明 稲 盛

足跡性T4の抗原性

本出願は1987年10月23日提出の米国特許出願第114,244号の一部新規出願であり、該出願は1986年8月21日出願の米国特許出願第898,587号の一部新規出願であり、これら特許出願の記載内容は本出願に含まれるものとする。

発明の背景

本明細書ではいくつかの参考文献を範囲内にアラビア数字で示し、これらの参考文献の一覧を明細書の末尾に附した。本発明が属する分野の現状を十分に理解するために引用されたこれらの参考文献の記載内容は本出願に含まれるものとする。

トリニンバ球の異なる機能クラスは、異なる構成的表面基團の表面の抗原性を保有する。ヘルパーT細胞は主としてマクロファージ及びB細胞と相互作用する、細胞障害性T細胞はより広い範囲の抗原保有性の細胞と相互作用する。これらの細胞障害素は、エフェクター細胞及び構成細胞の双方の表面分子の特異的結合によって媒介されると推定できる。T細胞の表面の特徴は、多段の多段及び非多段タンパク質を有することであり、これらのタンパク質の大部はトリニンバ球に固定されている。これらの分子の多くはモノクローナル抗体を用いた研究によって証明される。T4分子(または対応するマウスの分子IgT)の特異的エピトープに対する抗体は、前回講義T細胞増殖、リンゴカイン遊離及びヘルパーT細胞機能を阻害する(7, 8, 11-12, 23)。同様に、IgG(または対応するマウスの分子IgG2)に対するモノクローナル抗体は細胞障害性T細胞媒介キラー作用を阻害する(14, 15)。これらの現象及びT4とIgG2がクラスⅡ及びクラスⅠの分子の複数形調節を実行すると推定し得る。

既往のエフェクターT細胞に基づく違いを察すると思われる第2のクラスのタンパク質は、MHC分子の表面領域と結合する抗原を認識するレセプターである(16, 17, 18)。ヘルパーT細胞の相互作用は主としてクラスⅠのMHC

とのT細胞に共通であるが、2つのクラスの表面抗原の違いは常にT細胞の機能クラスの違いに基づく。このタンパク質はT細胞-細胞相互作用に用いた。

2つのクラスの表面分子はトリニンバ球の表面なセトから表面性タンパク質T4及びT8を識別する。他の表面性タンパク質T4及びT8は免疫細胞の表面に発現される(1)。米国免疾法において、T4分子はT細胞の相互作用的サブセットにおいて発現され、T細胞においてで発現されることはない(1)。分子にクラスⅠの生型相應適合性遺伝子複合体(HLA)を保有する構成細胞と相互作用するT細胞においては、他方、T8を有するT細胞はクラスⅠのMHC分子を既存する構成細胞と相互作用する(4, 5, 6, 7, 8, 9)。タンパク質のT4集団はヘルパー細胞を含み、他方、T8集団は及びサブレッサー細胞の大部分を含む(1)。しかしながら、希少なT4のT細胞は細胞障害性T細胞として機能でき(6, 10)、これはT8の免疫がエフェクター機能よりもMHCクラスⅠ常に(silencing)関連していることを示唆する。

これ得る。従って、トリニンバ球はMHCタンパク質決定基及び多段決定基を認識し得る独立の2つのレセプターである。これらのレセプターは免疫的T細胞集団を特異的標的とする役割を果たす。

ヒト先天免疫不全症候群(エイズ、 AIDS)の原因細胞が欠かしていることにある。その結果ヒトエイズ患者ではT細胞媒介免疫性が障害され、重大感染及び異常な新生物が発生する。エイズは、ヒトウイルス(HIV)と名づけられた環状レトロウイルス(HTLV-1またはHTLV-2)の集団がトリニンバ球に感染するによって発症する。これらの病原体の感染力の範囲、表面にT4特異性タンパク質を発現する細胞に固定され、従って、T4特異性タンパク質は表面相應の表面の分子として機能するだけでなく、エイズウイルスの現象も思なず。T4に対するモノクローナル

の観察された発現によって説明できな。

エイズではT4+ ドリンパ球の欠失によって認知性免疫不全が見られる。また多くの場合にはエイズに伴って、殆どが亜急性脳炎(*subacute meningoencephalitis*)に起因する中経脊髄症(CNS)の臨床障害が見られる。エイズウイルスのRNA及びDNAは終末細胞から固定され、神経系統患に罹患した患者の脳及び脛骨筋肉からウイルスが単離された。これらの結果は、エイズウイルスが細胞膜に感染し、致ウイルスがエイズ患者で標示されるCNS病変の直達原因であることを示唆する。又て、エイズはT4+細胞であると同時に同様性である。又て、T4がCNS中で発現されたのかまたは付加的免疫特異的表面分子がエイズウイルスのレセプターとして機能するのかを判断することが重要である。

T4及びT8の特異的相互作用の解明は、T4及びT8遺伝子を解明でき、それらの構造を決定し、種々の細胞環境に導入できれば容易に行なわれるであろう。T8分子をコードするcDNAの発見及び配列が最近報告された(19, 20, 21)。既発表されたタンパク質配列は、T8が免疫グロブリンL鎖の可変部との相図性を含む4本端ドメインをもつ脱結合型タンパク質であることを示す。

したがってマウス免疫グロブリンと共にインキュベートし、細胞をFACS-Cell Sorterで分離し、Vax-11/780コンピューターにより蛍光の対応性に対する細胞数としてプロットした。非常常状態HJB-3T3細胞及びL細胞は同一のサイトフルオログラフィーパターンを示した。Fig. 2-2はT8、T4+、T8-、T11+の表現型を有する白血病T細胞系であり、

LTH-4は全ゲノムDNAの発移性に持たれるT4+一次T細胞の特異性である。S1+はT4+、MVB14/neoレトロウイルス発現細胞で前質転換したHJB-3T3細胞系である。

第2図 T4及びT8遺伝子及びヒト細胞由来するRNAのクランプアロット分析

919のポリ(A)+RNA又は12μgの全RNA(双精)細胞及び細胞(ドリンパ球)を0.5%アガロース・カルムアルデヒドゲル内で電気泳動させ、GeneScreen (New England Nuclear)に吸着させ、³²Pで標識した0.6kb T4 cDNAインサートでアローブ

発明の要約

本発明は、ポリペプチドを含むセト免疫不全エンベロープタンパク質との複合体を特異的にすることが可能な抗体剤を提供する。本発明の1段階と、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+351～約+381アミノ酸配列に適合した約+8～約+185の第6図に示すアミノ酸配列を含む。本発明の別の発明によると、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+351～約+369のアミノ酸配列した約+3～約+105の第6図に示すアミノ酸配列を含む。本発明の更に別の発明によると、ポリペプチドのアミノ酸配列は約+3～約+185の第6図に示すアミノ酸配列を含む。

本発明は更に、ヒト免疫不全ウイルスに感染した治療方法も提供する。該方法は、有効量の本発明の抗体を用いて可能なキャリヤーと一緒に有効量の細胞因子を患者に投与することから成る。

図面の説明

第1図 DKT4及びDKT8を用いた面接着反応光散射のフルオログラフィーパターン
細胞(5×10⁶)をマウスモノクローナル抗体OKT4B.2と式にインキュベートし、洗浄し、その後、FITC

標識(100)、及びT8反応光散射ドリンパ球を含む。ドリンパ球レーンを4倍の時間で露光し、露満フィルムを撮影した。

第3図 pT4B.2及びT8遺伝子の制限マーカー地図
抗原万能及び粗抗体ペクター

A. pT4B.2 DNA及びT8遺伝子のDNA(1)周囲フラグメント。T8遺伝子におけるBam HI フラグメントの順序はテクノロジー分析及びゲノムクローニングにより決定した。pT4B.2及びT8遺伝子の5'末端のプロモーターはテクノロジー分析及びゲノムクローニングにより決定した。pT4B.2及びT8遺伝子の5'末端のプロモーターを点線により示し、pT4B.2の塗りつぶし領域はクランプ配列に對応する。指示した寸法の位はキロペンドである。

B. 配列決定方法。矢印はプライマメントをH13にサブニンゲンし、チューインターミネーター長(50)により切ることにより決定した配列範囲を示す。

ナーゼアコモーターに結合したホオマイシンホスホトランスクフェラーゼ遺伝子を含む。

第4図：非形質細胞T4細胞、並びにヒト細胞非リンパ性ヒト細胞からのcDNAのサンプル分析

10μgの細胞DNAをBam HIで消化し、0.8%アガロースゲル中で電気泳動させ、GeneScreenに吸着させ、ニック回収したpJ48 cDNAインサートでプローブした。指示した寸法の位置はキロベースである。全てのヒトcDNAには20kb、6.8 kb、4kb、1.8kb及び1kbの寸法のハイブリダイジングバンドが現れている。非形質細胞T4細胞のT4細胞は非形質細胞、ヒト骨髄穿刺細胞(CM)、ヒト神経元細胞(RB)及び1cells細胞を含む。CM、C958及びCP94はEDVで感染既発したヒトB細胞系に由来するcDNAである。LJ1-4はT4一次細胞の形質細胞である。SPH1及びESB2はT4ヒトT細胞由来系であり、E細胞及び胸腺リンパ球(Tlymph.)はT4細胞を含む。BL-CLL、Jurkat(Jurkatt)、Pro2.2、CEM及びKolt4はT4細胞である。E14はT4細胞の3'末端に位置する配列を含むデノムクローンである。

第5図：ヒトカウイルス発現細胞で感染既発したMIF313からのT4遺伝子タンパク質の免疫印染

全細胞外システィンには(●)は(○)を付した。リガーダー配列領域(L)、可変領域(V)、結合領域(J)、トランスメンブラン領域(TM)及び細胞内領域(CYT)領域を配列の下の水平方向の矢印により示したが、正確な境界ははっきりしない。2つの可能なN結合グルコシル化部位(Ecn-Lys-Tyr)も示した(COO)。

第6図：SPB胚芽から説明されるin vitro細胞RNA

完全な長さのT4 cDNAインサートをRNA表現ベクターpSP85(Procera Biotech)にサブクリーニングした。開発したアラスカcDNAをSP6ポリメラーゼ(40)で転写し、 λ -[³²S]-メチオニンを含有する小皮胚系(Bethesda Research Laboratories)で翻訳した。in vitro翻訳成物を10% SDS-PAGEアリルアミドグルコン中で電気泳動させた(レーンT4)。ウシ下垂体RNA(BP)を対照として使用した。相対分子量(Rp)をキログラムで示す。

2つの独立したMIF-313形質細胞細胞、本稿でリバーゲン形質細胞S53細胞からのタンパク質をレーンS1で示す。ヒラマメレクチンクロマトグラフに供給し、各タンパク質を活性化した。各サンプル2.5×10⁶細胞を活性化し、その後、GST4モノクローナル抗体(抗ヒトT細胞表面抗原)で免疫沈降させた。ビーズサンプル複数液に溶解させ、過剰(レーンS1-S4)及び(レーンS5-S8)条件下に10% SBS-ポリアクリルアミドで電気泳動させた。レーンS1は非形質細胞MIF-313細胞である。レーンS2は、T4C2、即ちT4-pYeosT馬頭菌開発したMIF-313細胞に相当する。レーンS3及びS4は、T4-pMyc6kDaneo細胞株で感染既発したMIF-313細胞である。レーンS5及びS6は末梢ヒトTリンパ球に相当する。相対分子量(Rp)をキログラムで示す。

第6図：T4 cDNAのヌクレオチド配列及びT4タンパク質配列

本図は、第5図に掲載した配列決定方法に従つてcDNAグローブpJ48のヌクレオチド及び予想される氨基酸列である。アミノ酸配列の上に示した数字は既知の位置を示す。右側の数字はヌクレオチド

第7図：細胞膜にまたがるT4グリコプロテインの構造

T4はタンデムVJ様ドメイン(V,J,-V,J,)と、膜に埋め込まれた水性セグメント(即ち膜貫通領域(charged transmembrane domain, CTD)とからなる。細胞膜の存在由来するGリコシル化部位は(---)である。T4遺伝子中のインストロン2-6の位置も(---)で示す。

第8図：T4の可変領域、結合領域及びトランスメンブランとイムノグロブリン遺伝子組合メンバーとのアライメント

A、T4の可変領域アミノ酸配列と、マウスカラバノグロブリンIgG5(60)、T8(20)、ヒトT細胞抗原-IgG1(93)(97)及びヒトT細胞抗原レセプターオンTα(98)とのアライメント。し線可変領域内の

トランスCはJ配列中に現れている。

B. T4の接種領域(jipiping region)アミノ酸配列とT4細胞DNAレセプターコーラーDNAのコンセンサスJ配列、イムノグロブリンラムダ及びカッパ鎖、及びヒトT細胞DNAレセプタードelta鎖のJ配列とのアライメント(99)。

C. T4のトランスマントラン組成とKBCクラスII B-鎖とのアライメント(100)。確定上のトランスマントランドメイン(TM)配列の下に示されている。

第10図:ヒト染色体DNAのT4接種領域の制限エクレアーニング

9つのエクソンの位置をグリムクリーンマップの作成、サインプロット分析及びエクレオチド配列によって調べた。リーダー配列(L), 可変領域と思われる領域(V), 接続領域と思われる領域(D), トランスマントラン組成(TM)及び相應性(C)領域は概略で図示されている。開始コンセンサス配列で包囲されたメテオニンコドンの位置はリーダーエキソン(L)の冒頭部分に示されている(46)。終結コドン(TGA)は第2細胞質エキソン(CIT)の末尾に示されている。ここに示した大きさの単位はキロベースである。

第11図:組換えレトロウイルス表現ベクター及び形成配列

してプロトクトした。感染ウイルス活力(EI-53)は、培養物の50%がウイルスに因して陽性を示す時の希釈度の逆数として示す(47)。自然に感染した「 \times 」細胞は、フィトヘマグルチニン(PHA)で刺激された正常鉢消リンパ球(+)とT細胞系CEX(+)とを含む。トランスマントランにかけられたT4接種領域はHSB2-1(+)(↑相対(+))とE431-T4(↑相対(+))とを含む。トランスマントランにかけられたT4接種領域HSB2-T4及びE431-T4(↑相対(+))は、これらの種差の対照として使用した。

第12図:T4-E431細胞鉢消細胞中のシンシンチウム(Synchrolym)

の測定

A. 2×10^5 の濃度HSB2-T4-細胞鉢消細胞を 2×10^5 のエイズウイルス感染細胞と混合し、37℃でインキュベートした。12時間後に培養液を調べたところ、離原シート中の核の90%以上がシンシンチウム中に含まれていた。

細胞の形成

ム。組換えレトロウイルス表現ベクター、pHY7は、向で直接的に産り出される2つのHolliday本縁を含むILTR(long terminal repeats)を含む。pHY7はミジンキナーゼアロモーター(lit)に融合され、オマインボスボトランスフェラーゼ遺伝子(hi)、T4E74B(70)又はTS(T9F1)(26)をコードする元のcDNAインサートを矢印の方向に從ってEco RI; ブクローンした。先々t4-pHY7及びt8-pHY7が形成。コーディング配列は影の部分で示されている。こだ大きな単位はキロベースである。

B. レトロウイルスを介する遺伝子トランスマントラン第12図:自然に用意された3つ形態複数されたT4接種

結果

細胞に、10倍ずつで希釈した一連のエイズウイルスを接種し、37℃で18時間インキュベートし、洗い落とし、モノクローナル抗体と共にインキュベートしてアレーティングした(cisaded microcolloids)。感染後12日目に、感染検査のELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)にて(46)。結果を、陽性検査物質ウイルス抗原)べた(46)。結果を、陽性検査物質ウイルス抗原)

既往歴分類

クラムA. 細胞(5×10^5)をフルオレセイン結合抗体又は抗T4(+)モノクローナル抗体と共にインキュベートし、細胞蛍光定量法(cytofluorometry)によって分別。抗体B. 細胞(5×10^5)をバッファ(+)又はエイズウイルス(+)と共にインキュベートし、洗浄し、フルオロホルニイズウイルス抗体と共にインキュベートして蛍光定量法によって分別した。

クラムC. 細胞(5×10^5)をバッファ(+)又はエイズウイルスの前の抗T4モノクローナル抗体(+)もししくはウイルスの前の抗T8モノクローナル抗体(+)をインキュベートした。洗浄後、フルオレセイン結合ウイルス抗体を加え、細胞を細胞蛍光定量法によった。

各細胞系の強度ヒストグラム(細胞数)蛍光強度

のポリ(A)-RNAマイクログラムと、大鼠皮質からのポリ(A)-RNA5マイクログラムとを1%アガロース・ホルムアルデヒドゲルを介して電気泳動にかけ、By bond(bacteriophage)上にプロットし、³²P-標識T4DNAインサート、pT4B(70)でプローブした。

2. マウスRNA試料のノーダンプロット分析。前段及び後
端373細胞(雌性玉ねぎ胚)からのポリ(A)-RNA 52.1クロド
ラムと、胸腺からの純RNA 20マイクログラムとを1%アガ
ロース・ボルムアルデヒドゲルを介して電気泳動にかけ、
Agfa 200上に及び、³²P標識Labeled RNAインサート、pGST-6Bで
プローブした。

第16回：ヨコハマのアラスカドマップ

プラスミド pT4BBFRK-Iのリーダー及び細胞外セグメントをコードする T4eORF4クローン pT6Bの Eco RI-1257 を含む pUC18 諸導体である。この pT4eORF4 は S7490 初期 (early) プロモーターとウシ成長ホルモン遺伝子のポリアデニル化領域の前の T4E 起點コドン (インセット) を含む合成リントーとの間に挿入する。pT4発現カセットは、β-グロビンプロモーターとマウス dhfr コーディング配列と SV40 ポリアデニル化領域とで構成されたマウス hprt 発現カセットに結合する。

58測定を行つた。

八、8日目に引いて陽性を示した感染動物のウイルス
イノキュラム希釈度のプロット。

B. 4日後の、8日目及び12日目のID-50(培養液の50%が培養液を示す時のウイルス希釈度の逆数)のプロット。

C. BIVの 10^{-1} 希釈液を使用した場合の、6回目に引けに両して陽性を示した培養物質対照々の \log 濃度のプロット。

（以下空四）

第17回：改元とストダラム（越前守内道左衛門）

EF4はEF-CEH細胞へのBITの結合を阻止する。EF1
 フア(—'—')か、EF6と共に予めインキュベートし、
 (—)か又は非形質免疫血清DXB-12相溶(---)からの
 上澄みと既に予めインキュベートしたBITと共にイ
 ベートし、洗浄し、フルオレセイン結合BIT抗体
 し、細胞蛍光定量法によって分析した。蛍光マス
 (細胞数対蛍光強度)を示す。

第18図：HIVによるHIV感染症の臓器

HIVイノキニラムの感染性測定(1B・50アッセイ)10倍ずつ稀釈した一液のカイルスイノキニラムを3
ンジケーター細胞(HeLa)で測定したヒトリンパ球)と
時間インキュベートする。次いで細胞を洗浄し、
カルチャードプレーティングする(培養当たり1×1
cm、無機物当たり10の培地)。4日目、8日目及び12
日目培養アッセイによって上澄みを換案し、HIVを
細胞の発育の30分前にHIV基質液に加え且つ実験の
最適条件下に稀釈した9.8μg/mlのaT4を含む培養(図)
最初の1B所間のイノキニラムの種で導入したaT4を
少(○)、あるいはaT4を食さない培地(□)(対照)

光明の詳細

本発明は、ポリペプチドを含むとト免疾不全エセンペローアグリコプロテインと複合体を接着印し導き治療薬を提供する。本発明の1つの実施形態は、ポリペプチドのアミノ酸配列は、第6図に示した配列約+851から約+369に融合したアミノ酸配列から約+185を含む。本発明の別の実施形態におけるペプチドのアミノ酸配列は、第6図に示したアミノ酸配列約+351から約+389に融合したアミノ酸配列約+3÷100を含む。本発明の更に別の実施形態におけるペプチドのアミノ酸配列は、第6図に示したアミノ酸配列+3から約+185を含む。

更に本発明は、ヒト免疫不全ウイルスに感染した治療するための治療薬として有効な医薬的組成物を
る。この医薬的組成物は、ヒト免疫不全ウイルスコ

フェート溶液液または0.8%生理食塩水を含む。

更に不透明は、ヒト免疫不全ウイルスに感染した患者の治療方法を提供する。この方法は、患者に感染した免疫不全ウイルスをT4細胞に感染できないようにするために、

患者に、医薬的に許容可能なキャリヤと、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープグリコアロテインと精査共を特異的に形成し得てかつホモ接觸に可溶性を示すが発明のアミノ酸配列とを含有する医薬的組成物を有効量投与することからなる。

T4タンパク質のin vivo生化学的及び免疫学的活性の活性化は、このタンパク質がHIVの予防及び治療に役立つあることを示した。研究によって、dT4タンパク質はウイルスの細胞外及び細胞から細胞への伝播の阻害剤として作用することが判った。培養において、dT4はウイルスがdT4と細胞に結合するのを遮断することが判ったので、dT4を感染者に投与すると、ウイルスの細胞外伝播を阻害する作用があると考えられる。従ってdT4は、

HIV治療の予防及び治療の両方として役立つことがある。予防策としてのdT4は、この病気に対して高い免疫性を有する個体、またはウイルスに対する抗体の存在によって

か治療は、ウイルス媒介の感染及び細胞から細胞への伝播を阻止すべきである。更にdT4は、他の状ウイルス用、例えばアンドナミシン(AZT)と組み合せて使用してもよい。

本発明のdT4タンパク質は、T4細胞標的の阻害剤としての有効性も有する。多くの研究によって、免疫細胞、特に自己免疫疾患の発病及び進行並びに宿主特異的細胞と細胞反応におけるCD4レセプター(CD4はヒトdT4レセプター及び他の哺乳動物細胞におけるその該等特質に対する一般用語である)の重要な役割が示された。dT4特に特に重要なのは抗CD4 Mabsを用いた観察である。これらのCD4レセプターとの結合によって、これらのMabsの持続のものは自己免疫疾患及び移植片拒否反応改善する。かかる作用の例としては、T細胞によるIL-2産生、例えば特定の抗CD4 Mabsによる抗原誘導性増殖、リンカイン分治及びヘルパー細胞機能の誘導性増殖、

RIYに暴露されたことが判る個体に投与される。1段階または後で現れる前に有効量のdT4を投与する。T4-リンパ球のRIY感染を阻害するように作用するとしては、RIYに感染した人にdT4を投与すると、細胞外伝播を阻害するように作用する。

RIY感染細胞と他のT4-リンパ球との融合もまた併発の過程であるらしい。更に既知は、感染個体T4-リンパ球表面の損傷及び細胞内にはT4-リンパ球の一部原因となり得る。細胞融合は、ウイルスエンベロープ遺伝子医生物及びdT4レセプターの両方に依存し、または膜貫のモノクローナル抗体(Habs)(120)によられ得る。dT4は細胞融合に干渉し、従ってウイルスから細胞への伝播及びT4-リンパ球機能の損失を引き起こすことが期待される。

D4レセプターは同一構造であって、dT4は、全てのdT4レセプターの表面ドメインを認識するウイルスの阻害剤であると理解される。

D4は他の医薬と組み合わせて、例えば逆転写酵素リバーゼまたはHIVのことわざのdT4タンパク質薬剤と共同して使用することができる。RIYに付す

MabsがCD4に結合した結果の分子は阻害ではない。CD4とその配位子との結合を遮断することができない配位子はHIVクラスI抗原(121,122)における保有であることが立証されている。しかしながら同じMabsの少なくとも幾つかは、見掛けのクラスIIによってCD4表面活性化を阻害する。

更にdT4は、恐らく、通常はdT4レセプターの表面ドメインと相互作用する細胞外領域分子には含まれることに細胞の抗原物質としてT細胞細胞表面に阻害される。MabsとdT4との区別は、重要な免疫血清蛋白質とした。例えば、T4に対する幾つかのMabsはT4細胞表面と引き出され一方、dT4は、MHCクラスI抗原を細胞において表面を引き出すことができる。またの様なクラスI配位子に対する親和性は、dT4に対する親和性が高いのと比較すると極めて低いよう

の量及び割合は、血液中に有効量の α T4が供給されるようになると証明される。別の投与媒体としては α T4を透析剤として使用する体外透析がある。

更に本発明の α T4タンパク質は、T4細胞相互作用の治療または阻害剤として作用する天然、合成または組換え分子に対する試薬として使用することができる。

例えば、 α T4タンパク質は、T4レセプタの表面ドメインと相互作用の透析物質を分析するための他の試薬と組み合わせて使用することができる。左側面的に複数の水溶性試薬を提供するための、ELISAに基づく方法によって固定されるタンパク質相互作用の分析といったふるい分け分析に使用することができる。例えば、 α T4は α T4-T4タンパク質又は α T4- α T4タンパク質を含むする混合物に結合するので、これは、ウイルス結合の混合物のみでなければ使用することができます。 α T4が α T4-T4タンパク質を発現する細胞に結合することを示すは、 α T4データに基づき、 α T4も、 α T4- α T4タンパク質に対する選択性的分子として作用することができる。類的特異的キャリヤタンパク質としては、 α T4は、例えば、感染細胞に対する細胞障壁の分配のためのキャリヤタンパク質として作用することができる。

第三は細胞相容である。本発明の別の実施形態においては細胞相容は*Escherichia coli*株である。本発明の更に別の実施形態においては適当な宿主は真核細胞である。本発明の更に別の実施形態においては、真核細胞は哺乳動物細胞である。本発明の更に別の実施形態においては真核細胞は酵母細胞である。本発明の更に別の実施形態においては適当な宿主は昆虫細胞である。

更に本発明は、T4レセプタの干渉される細胞外ドメインで構成される α T4を産生する手段を提供する。T4 cDNAのT4レセプタのリードードメイン及び細胞外ドメインをコードする部分、即ち前 α T4を使用し、哺乳動物において α T4を過剰発現(over-expression)できるベクターが構成される。三つの α T4の配列は以下の通りである。

更にT4レセプタが、T4細胞のクラス別膜によつて異なる状態提供相応に内付するHICクラスと反並時に結合することを示すデータに基づき、T4のリードードドメインと組み合せて使用することができる。その構造分子との両の直接結合分析に基づいた上で、 α T4誘導に対する生化学的結果は依存するより分析を行なうことができる。

更に本発明は、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+851から約+889に融合したアミノ酸約+3から約+185を含むポリペプチドをコードするベクターを提供する。本発明の別の実施形態においては、ベクターは、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+853から約+889に融合したアミノ酸配列約+106を含むポリペプチドをコードする。本発明に別の実施形態においては、発現ベクターは、そのアミノ酸配列が第6図に示したアミノ酸配列約+3から約+185を含むポリペプチドをコードする。

更に本発明は、本発明の発現ベクターを含有する細胞を提供する。本発明の1つの実施形態においては、

sT4用コーディング配列は、例えば公報のcDNA配列を使用する遺伝子の場合、配列に亘る各導入部位及びタンパク質の探知による選択的、即ちcDNAクローンのT4発現細胞系からのトランスフェクション及びタンパク質に対する抗体による識別により得られる。sT4用コーディング配列を構成するcDNAクローンはオリゴヌクレオチドハイブリゼーションプローブの使用により鑑別される。プローブはT4タンパク質の公知の配列に基づき設計されている。sT4用コーディング配列を組立クローンを媒介したコーディング配列は初期エンドヌクレアーゼを使用して開放され

(excised)、クローニング及びノースは発現ベクターに挿入される。発現ベクターでは、sT4用コーディング配列はコーディング配列の起始、翻訳及び適度に必要な又は所要される調節機能に有効に(operatively)結合されている。

翻訳活性は、例えば既存配列カボリアテニレーシヨン及び増進のような他の発現と同様に、RNAポリメラーゼ活性及び既存に必要な機能を含んでいる。プロモーターは、例えば発現が仔鼠配接クローンの軽量及び重鉛まで精選されないように調整し得る。本発明の実施に有効なプロモーターは例えばsT4初期プロモーター及びラクス内種ウイル

シコカルミシン(cyclocoelomeric)既存遺伝子を含んでいる。

哺乳類の細胞での転写及び翻訳の後は、リードー配列が認識して現れ、成熟T4がならし培地内に合成される。

本発明の最も美しい実施例では、sT4用遺伝子は人間のD-148又はマウスのジヒドロ黄胆レダクターゼ(DHFR)のミニ遺伝子に結合されて発現ベクターを構築する。

sT4用遺伝子は、例えば選択マーカー及びこれらの遺伝子とのコートランスフェクションを通じて遺伝子発現を粗略的に増幅する手段を検討するために、人間のB-16又はマウスのDHFRに結合されている。共通の選択マーカーは、例えば同様の遺伝子の單一コピーと同じように少ない筋を込みるために選択するDHFR、G418又はハイグロマイシンを含んでいる。例えばDHFR系のメトトレオセート(mtx)との堆積の相用、遺伝子が過剰発現する。

ス、モロニー内種ウイルス又はサイトメガロウイルスのロングタームナルリピート(LTR)を含んでゐる。核内に先立ち、sT4ミニ遺伝子、即ちT4用遺伝子の一上細胞外ドメインとをコードする遺伝子半は、通常マーカー系を含むより大きいDNAs分子内に組み込まれが若ましい。選択マーカー系は、トランスフェクション細胞内に検出し得る表現型変化を容易に引き起す遺伝子からなる。かかる表現型の変化は、例え是一カス類似又は薬用耐性であってもよい。このようとして例えばG418又はハイグロマイシンSに抵抗する遺伝子がある。又は、キサンナンゲアミニホスホルトランスフェラーゼ(xprt)、チミジンキナーゼ及びガラクトキナーゼ(galT)のような他の選択マーカーも、遺伝子増幅を可能とする選択マーカーは、トランスフェクション効率を増して、又は周囲の遺伝子及び選択の細胞内複製を増強させてコピー数を増大させる使用され得る。選択子のコピー数の増幅にも役立つうなマーカーは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(メトトレオセート)、CAD(ドーオスカントセラル-レルテート耐性)及びアデノシンデアミナーゼ(アーテ

的に結合することができ、又はこのような機能をもつこともできる。Axelの米国特許第4,899,216号を参照のこと。

哺乳類細胞での遺伝子合成物の過剰発現は、一時的又は安定した手段により行われ得る。一時的な過剰発現クシニアウイルスベクターの使用のようなら、又は5'-40複製を支擋する細胞内のSV-40ペースのベクターを使用するような遺伝子増幅方法により行うことができる。これらの方針は最終的に細胞の死につながる。安定剤発現は、マルチブル遺伝子コピーの世代、例えは堆積用選択又はD-148プロト-1遺伝子の使用を認め得る。

D-148遺伝子系を更にヤコートランスフェクションとするとsT4タンパク質の過剰発現は、多くの異なる相用して得られ得る。若ましい細胞系は培養阻止

増幅により得られるメトトレキセートを有するDBFFR(DUFZ/HIZ技術)を使用するとき、中国のハムスターの腫瘍の細胞系(CR)が好ましい。若に、DBFFRの欠如したCDD細胞が使用される(116)。使用し得る他の細胞の例は、例えばDBFFRに

なるようになって、改進の希望の相談を含んでゐる。

あるBBERに超級の配は、メトトレやセートに分して正常

DEER(hxel)米国特許第4,899,218号)は、通常在るのない実用

DERR細胞は正常DEER遺伝子及び目的的性状選択可能な遺伝子例えばG418耐性遺伝子(117)を使用し作る。トランスクレクションは標準技術を使用して実施する(118, 119)。これらの技術は、例えはリン酸カルシウム沈降、DEKE-デキストリン優先ピノサイトシス、エレクトロポーラーション法等の技術を含んでいる。

トランスフェクションの後に、型式可認性遺伝子の増殖を可能とする組合子で、ヨウミニ遺伝子を担う細胞を通過活性で培養する。種々の哺乳類細胞の特異基、例えばヒボキサンテン及びチミシンがなく10%のウシ胎児血清を含むF12組成(CFC CO. グランドアイランド、ニューヨーク)を用い若し染色。細胞形成は30~65°Cの常圧で進行する。並祝成

本発明の、 α -T4は、 β -T4の表面外ドメインの複数体を含む。
そのような複数体は倍列、欠失及び置換を含み、これらの
変更はならし培養中のタンパク質分泌及びタンパク質の
BT4 BT4タンパク質由ちの120への親和性に匹敵する
を及ぼさない。例えば、1回または数回のアミノ酸を日本語
または北京語に付加し、またはこれらの一端から除去し得
る。あるいはまた、3回または数回のアミノ酸、少なく
は4個未満のアミノ酸を内部アミノ酸に挿入し、内部アミ
ノ酸から除去し、または内部アミノ酸と置換し得る。他の
場合には、 α -T4とタンパク質キャリヤー、別の複数または他の
の β -T4分子との間にハイブリッドタンパク質即ち複数融合
体を形成してボリ- β -T4分子を表現することも可能である。
更には、BT4はキャリヤー分子に合成的に結合させ得る。

814精算体の一例を後述の成績表に示す(表題例8參照)。

874の前記 any 残物性は、既知の揮発性を有する官能分子を

生き残り、また高レベルの α -1タンパク質を発現すれば、更に培養を行うために選択される。このよう選択的条件下で培養し、製品である α -1タンパク質して精製する。

本発明の実施例で使用し得る細胞培養方法は、
着締固の使用又は浮遊させた細胞の培養を含んで
らし始終(CM)は浮遊させて又は固定支持体に付着
した細胞から採取することができる。即ち、CM
で又は固定支持体で成長させ、また浮遊させてス
ル化した面しくはパリタしたベッドで培養した竹槽
を用する。CMは既述したタンク容器の浮遊細胞か

卷之三

—ゲー遊び／または植物外ドメインのためのコード配列を操作することによって表現前に進化学的に

本説明の \pm は左端既存店地から、柔軟なタンパク技術、例えば既存位クロマトグラフィー、イオウクロマトグラフィー、サイズ排阻クロマトグラフィーまたは凝縮クロマトグラフなどを採用し得る。

SHは通常の薬剤質的殺菌剤、例えば炭水化物酶
シドまたは尿素酶和化リガンドを用いるか、またも
特異的に結合するリオンド、例えばモノクローナ
ル抗体IV-ep120タンパク質もしくはその一部を用い
得クロマトグラフィーで検出できる。

精査は勿文様、(2)無血精液が成長培地で細胞
せらること、(2)をもし培地を透明にすること、及

血清含有培地から譜製することも可能である。

BT精製の好い一方では、初めて培養をイオン交換カラム、詳しくはS-Sephadex[®](スルホアコピルセファローズ)カラムに通し、このカラムはBTと結合する一方で大部分の汚染タンパク質を通過させる。次いで、硫酸鈉溶液を用いてタンパク質は弱を溶離させる。第2のイオン交換カラムを用いる。詳しくはD-Sephadex[®](第四アミノエチルセファローズ)カラムであるこのカラムは、試料中に存在する汚染タンパク質が該カラムと結合し、一方BTは結合せず、カラムを酸性緩衝液から回収されるよう特性を有する。最後に、過酸化水素を除去するべく過酸化水素カラムを用いる。

BT精製の別の方法では、BTに対するモノクローナル抗体を用いる。BTに対するモノクローナル抗体と結合する親和性ゲル沈降法に確実にした培地を適すことにより、BTタンパク質を1操作で精製できる。BTは抗体結合部位でカラムには結合し、一方汚染タンパク質は出てカラムを通過する。その後、BTカラムから、BTタンパク質の不活性化を防ぐ条件下に温存する。

本発明は更に、ヒト免疫不全ウイルスエンベロープ様ダ

スから成るBTは可溶性タンパク質として細胞表面抗原中に分離され、そのコンホーメーションはレセプター異同ドメインの発現を強調するように見える。即ち、BTは詳細な構造分析、特にY接合点に適応である。BT構造、または他の相互作用分子との複合形態を取るBTの三次元構造を決定することによって、BTに関する基礎的基礎研究及び作用機序の理論的設計のための基礎が提供される。

本発明の段階する我々がHIV予感及び免疫法は、ここに示した新規なタンパク質、抗体及びDNA分子が特定分子との複合体またはハイブリッドを形成し、AIDSウイルスの細胞に有効な免疫学的応答を実現する能力に基づく。本発明の分子、該分子の製造方法及びHIV治療方法は、説明のために表示したもので請求の範囲内に規定した本発明の範囲を全く限定しない次の実験及び実施例を参照するとによって更に良く理解されよう。

ンパク質との複合体を特異的に形成し得る上述のうちのいずれかを製造する方法で、治療剤の製造をする适当条件下に本発明のポストベクター系を成長すること、及び製造した治療剤を回収することを含む方法とする。

BTは、BTタンパク質または該タンパク質と相互する分子を検出する診断測定法に用いることができる。即ち、BTに対する抗体の対応量: 治療において個々が有る。

BTはまた疾患の診断試薬、例えば標準的な免疫吸着法(ELISA)、抗体イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイのRIAまたは他の種類の分子の発現に用いること。BTは、OKT4、OKT4A、及びOKTレセプターの他のヒトーネのほとんどがまだは述べておらずして、BTレベルの絶対的対応量に適用できる免疫診断測定法有用である。現在、BTレセプター対応のための抗体 BTレセプターは、三つの異なる化学的環境、即ち水性細胞表面、膜水性膜、及び疎水性水性細胞質にある。これらの異なる環境がレセプターの、その完全状態での機能を防ぐことから、細胞内外メ

【実験および方法】

【組成および抗体】

「Cell Biology」書籍の記載によつて準備した血球はヒツク云の抗細胞ロゼット陽性(E+)細胞このE+集団内のT4⁺サブセットとT8⁺サブセット-T8抗体と、アフィニティー柱用カラム-マトリクスに結合したヒト赤血球を用いたT8五重網の上に用意した。これらOサブセットをサイトフルードで分離したところ、T4⁺細胞はT4⁺が95%、T8⁺細胞はT8⁺が95%、T4⁺が2%で示された。

「Cell Biology」(2-2) Tセルライン(T3⁺、T4⁺、T8⁺)に、元分室型細胞白血病の成人患者から得たはT3⁺、T4⁺、T8⁺、T11⁺であり、Raji(T3⁺、T4⁺、T8⁺、T11⁺)である。OKT14は、パ性白血病であり、T3⁺、T4⁺、T8⁺、T

特表平2-503

記載されている(28)ようにして用いた。

アフィニティー精製したウサギ抗マウスIgGは培化クロム凝(24)によってヒト赤血球に結合した。

I 細胞とHAT細胞の細胞質膜

キヌミ L "IK" 301 細胞は、10%ウシ血清(Gibco)と5.0 mMシアミノアリン(DAP)を補充したBalboceko液(= Eagle 培地(DME))中に懸滴した。L細胞を、培养瓶の1日前に 30 ml の皿に 5×10^4 の細胞密度でプレートアウトした。リン酸カルシウム沈着物は、Krieglerら(26)によって改良されたBrahamとvan der Ebの方法(25)により、四倍たり 100 mg のDTXと 2.0 ml の過分子量T細胞またはL細胞DNAを用いて調製した。次の日、L細胞を10%ウシ血清、 $15\text{mM}/\text{ml}$ ヒドロキサンチオ、 $1\text{mM}/\text{ml}$ アミノブテリンおよび $5\text{mM}/\text{ml}$ メチミファンを含むDME(HAT培地(27))中で培養するに配置した。IK-赤血球抗体は、12~11日のHAT培地の进口セットアンセイを用いてスクリーニングした。

キヌミ HAT 313 細胞は、10%新生ラム血清(Gibco)を補充しDME中に懸滴した。HAT 313 細胞を、培养瓶の2日前に 30 ml の皿に 5×10^4 の細胞密度でプレートアウトした。これら2つの細胞に、 10mg のチャリヤー-DNAならびに 10mg のTd-RNA(=

(5×10^4))を表面に懸滴したOKT[®]A、OKT[®]Bまたはコントロール抗体と共にチューブに入れた。この細胞二液混合を10分間インキュベートした後cyclohexatinで二回洗った。細胞にフルオレセンスシグナート(FITC)結合ウサギ抗マウスIgG + A + Ig (Cappel)を加え、4°Cで1時間インキュベートした。次いで、細胞をcyclohexatin中で三回洗い、 0.9% ナトリウムアクリドを含むPBS 0.5 ml中に再懸滴した。この細胞をSector Dickinson FACS IVセルソーターで分析し、データをためてYAX 11/780コンピューター(Digital Equipment Co.)を用いてプロットした。

RNA/cDNAの純度

細胞を4Mチオシアン酸グアニクリニクム中でホモゲナイジョンして全RNAを単離した後、 5.1 M のCsCl液を過して粗抽出した(28)。オリゴ(dT)₃₀、セルロースクロマトグラフィー(1900 g、Collaborative Research)(29)によってポリ

RNA液または 10ml のT4-pVc03T および 50 ml のPSV:リン酸カルシウム液体を頭部を頭部した。2月齢、 $\pm 10\%$ ウシ血清と $500 \text{ mg}/\text{ml}$ のGentamicin[®]をDME中に混入下に配置した。混入培地中で1倍生産するコロニーに応じてロゼットアンセイロジットアンセイ。

プレートをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗い、そのプレートを、 5% ウシ胎児血清を含む $1/500$ で希釈した稀釋セノクローナル抗体OKT[®]2.5 種と共に室温で45分間インキュベートした。PBSで三回洗いやかビアツイで過剰の抗体を除去したウサギ抗マウスIgG残存に結合したヒト赤血球を用いてDCC(=Dextran-coated charcoal)を用いて洗浄した。PBSでコロニーの枚数に応じて過剰の赤血球をPBSを加えた。

サイトフルオロメトリー分析

接着性細胞をPBS中の 0.005 M のEDTA[®]、 5% ラム血清アルブミン(BSA)と 0.01nM cytochalasin Bを含むPBSで一回洗った。3.

のcDNAを合成した(28)。EcoRIメチラーーゼ・ポリメラーゼで処理した後、二本錆のcDNA・リンクターを用いて $32\text{P}(30)\text{ U}$ のEcoRIが位に切断した。Charon 4ヒトゲノムライブラリード[®](Harvard University)(31)から更に分離して一部を切ったcDNAプローブの合集。

Davisら(32)により記載されているようにして抗体LTD-4から得たオリゴ(A)・RNAから得たcDNAを合成した。このcDNAを過剰の細胞のオリゴ(A)・RNA(ロット=3000)に混合した後、ヒトcDNAに含んだ一本錆の配列アバタイトクロマトグラフィー(32)によって粗細胞を除く(subtract) cDNAプローブをフィルタライゼーションにかける間にG-50 Sephadexカラムで粗化した。G-50 Sephadexカラムで粗化した

および $5 \times SSC$ 中で 42°C で行なった。このcDNAライブラリーのスクリーニングにおいて、 $137 \mu\text{g}$ ニトロセルロースフィルター当たり $6 \times 10^4 \text{ cpm}$ の一級を次くプローブを用意した。ゲノムライブラリーから得たフィルターをニック翻訳した(34)。cDNA導入物にハイブリダイズした。 65°C で洗浄し、最後に $0.2 \times SSC$ で蒸発した。増添スクリーンを存在させて -70°C で1~2日オートラジオグラフィーにかけた。

DNA配列決定

pT480制限断片をM13ベクター-m18およびm19(36)中にサブクローニングした。配列決定反応はシデオキシチエインタミネーション法(38)を用いて行なった。配列決定の方針(Strategy)を第3B図に示す。

Seuthergenとy Northernプロットハイブリダイゼーション

高分子量の細胞DNAを、製造業者(Boehringer Mannheim)の推奨するところに従ってDNA 1相当たり5単位の制限ヌクレアーゼで用意した。サンアル(10μg)を0.6%アガロースゲル上で電気泳動にかけた。DNA断片をGene Screen(Bio-England Nuclear)(37)に移し、ChardetとGibco(38)により記載されているようにしてハイブリダイズした。

RNAを0.8%アガロース・グルコアルデヒドゲル(39)上に

洗し、GeneScreenに移した。Kocherのハイブリダイゼーション結果の視認する手順に従って実施した。6001トモKocherのプロットカラニック翻訳したプローブにイズした。

SDS RNAの合成およびin vitro翻訳

TDOT4cDNAをDPBS(Protege Diolot)のEにサブクローンをし、Hind IIIで取扱した。放物線クレオチドをヨウ素セサニン(CP)とボリメターゼセサニンしたプラスミドDNA(1μg)を脱水するには煮沸の通りにしたが、乾燥バッファーにはEDDQと未凍結を蒸留した。反応混合物1/10量、L-[^{35}S] - (Afersham)と1μgのS-アチノシルメチオニンを無添加(Rehonda Research Laboratory)で調製し、in vitro翻訳反応を下記の諸元条件にてSDS-ポリエチレンジアミンにかけた。

翻訳装置、レクチンクロマトグラフィーおよび免疫反応記載、レクチンクロマトグラフィーおよび免疫反応記載(41)述べているようにして、10%の生乳清と1μCiのL-[^{35}S] - メチオニン(Afersham)メチオニンを各々ないDME培地中で12時間育成をこの瓶内を、0.5%Nonidet P-40(Shell)および6%

ルメチルスルホニルフルオライド(41)(BSA)を含有する10 mMのTris(pH 7.4)、150 mMのNaCl(ITS)中に同定した。培養物を $100,000 \times g$ で10分間心し、上清をIodo-6(42)の手順に従ってレシス豆レクチンクロマトグラフィー(Pharmacia)にかけた。粗抽出液を、コントロールのマクス管水およびプロテインA-セファローズ(Pharmacia)の混合液を用いて一回りCで1両度、そしてプロテインA-セファローズだけを用いて二回りCで1両度浮遊吸着させた。次に、各上清のうち $2.5 \times 10^4 \text{ cpm}$ を10 μMのモノクローナル抗体(約1mg/ml)およびプロテインA-セファローズと反応し、ターンテーブル上で4°Cで一夜インキュベートした。次いで、ビーズを0.5%のNP-40と0.2%のSDSを含有する治ITSで四回洗い、電気泳動サンプルバッファー中に再度転換した。

グルコン酸化

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はLeeball(43)の手順に従って実施した。無脂溶性物質in vitro翻訳反応を2-×

血筋臍膜反流液およびロビットアフニ

マクスの2細胞(44)は、10%ウシ由清(CS)に充満したBulboceの底性Tissue Culture(DME)中に置いた。2細胞は、当該妊娠の2日前に10μgの当あたり5mg密袋でプレートアウトした。リン酸カルシウムWolferG(27)によって改良されたGrahamとvan der Kooij(25)によって調製した、10μgのカリドー-DNA A(24)または10μgのTS-RNA(2)を用いて核酸物を離した。2日前、これらの細胞をDME/10%CSとG418(Gentamicin)、Gibco)中で底液下に配置した。

特表平2-503

T_4^+ 又は T_8^+ コロニーを固定するための Rosetting Test せばに、特定培地中の生菌から 3 時間後生存コロニーで実施した。リン酸緩衝食塩水 (PBS) を用いて 2 回リシスした後、ブレートを 5%ウシ胎児血清 (FCS) 含有 PBS 中で 1/500 稀釈した稀釈液ノクニーナル抗体 OKT^① 又は OKT^② 8 (1ug/ml, Ortho) 0.5 ml と一緒に空瓶で 15 分間インキュベートした。ブレートを PBS 中で 3 回ゆきしく振るして、過剰の抗体を除去した。細胞ウサギ抗マウス IgG 抗体 (2% v/v) ストック懸濁液、PBS / 5% FCS 中で 1/10 稀釈) を接種したヒト赤血球を添加し、ブレートを空瓶で設置した。15 分後、過剰の赤血球をゆっくり吸引し、残置の間に PBS を添加した。 T_4^+ 及び T_8^+ の 2 クローンをコロニー型態により確認し、その個性をフローサイトメトリー及びノンサンプリット分析により調べた。

追跡ヒレトロウィルスの発生及び感染

10^5 c.f.u./ml の力値を有する組換えヒレトロウィルスストックを滅活する T_4^+ 及び T_8^+ の 2 クローンを用意した。ウイルスストックを T_4^+ 又は T_8^+ の 2 クローンの近縁細胞 (near confluent) 單層に新鮮な DME / 10% CS 10ml を添加

後し、HeLa 細胞では 1 時/回、原種細胞についても 0.5 時/回とした。組換え両性ウイルス (4-113) を産生する全ての細胞培養物を 3 衍育条件で保存した。

AIDS ワイルス

HTLV-1 / LAV のプロトタイプ LAV 開株を J-C. Croom (Posterior Pituitary Tissue : (16)) から入手した。本研究で使用したウイルスは、或る実験室の第 2 - 第 5 代細胞由来のものであった。接種物は、且下 HTLV-1 / LAV - 感染初期胎仔血清悬濁液 (PAM) - 初期末梢白血球 (過濾倍率 300× まで 7 分間処理した後 1500× まで 90 分間実施) により高めた] の培養上清であり、沈降室中央で保存した。検出実験のために、ウイルスを、上記の如く 30,000× g で 90 分間の留置により求めた胎仔血清懸濁液から 0.01M Tris, 0.1M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 中の Immunoprecipitation (E.R. Squibb) 15% クッションを用いて濃縮した。

して作成した。24 時間後、培地を取り替わ、0.45 μm (Millipore) を用いて通過した。感染のために細胞を、82g/ml polybrene (Aldrich) の存在下上清 (又は希釈液) 2ml と一緒にインキュベートし後、細胞を培地 3 ml を添加した。感染から 3 日後、 10^5 c.f.u. G418 含有 DME / 10% CS に移接種し育させ、G418^r コロニーを計数し、*In situ* rope はフローサイトメトリーを用いて吸収 T_4^+ 又は T_8^+ を調べた。

2-2 培養上清を用いて、上記したマウスウーハー焼した。 T_4^+ 又は T_8^+ 細胞トランスマント (solid rosetting assay) はヒトコロニー細胞により精製 T_4^+ 又は T_8^+ 非粘着性トランスマントをセンス細胞セルソーティング (FACTS) により精製者ヒトリンバ球細胞系 (HSB2, RPMI- Raji-B細胞) 及び粘着性上皮細胞 (H.E.L.) 及び T_8^+ の A4 脱離 (10μg/ml マイトマイ 2 時間予前処理、Sigma) と共に培養して感染させ、細胞系を 1.5 ml/ml の濃度での G418 耐性について

の異性を調べた。1/2 G 分離の一郎を、上記した如 30.8%) フルオレセインイソテオシアネート (PIT たんぱく質比 = 10.9 μg/ml) 、ナースラディオシグマ (CHPO、タイプ VI、Sigma) 及びアガロブリングさせた。非免疫細胞からの IgG 混合物も改した。

逆トランスクリプターゼアッセイ

Mg 存在の反応逆トランスクリプターゼ (RT) 7.5mM Mg²⁺ (59) の反応で (A) μ (dT) 11 コントロールとして () μ (dT) 12-16] の時一を別いて測定した。

細胞質 HIV-1 p24 ワイルスのりい免疫検出

免疫細胞 (0.1 ml 1×10^5) をガラススライド (Sanderson cytocentrifuge) 、95% ニタール - 5 20°C で 30 分間固定し、PBS (0.01M PO₄, 0.1 NaCl, pH 8.0) を用いて 10 分間 3 回洗浄した

リップの下に放置した。690 メバワーの照射照度の LAMP-
6710plus 照度録で、スライドを調整した。これらの条件下で、
HTLV-1/HTLV-III/LAV 混合は HTLV-1/HTLV-III/LAV
に対して供試である。未感染の PHA 刺激細胞、Epstein Barr
(EB) ウィルス感染 B 細胞系、アデノウィルス-感染細胞系、
T 細胞系並びに HIV-I 及び HIV-II 感染細胞系は染
色されなかった。

D VSV ウィルスイムノアセイ (抗原捕獲アッセイ)

培養 HTLV-1/HTLV-III/LAV の力価測定のための微小培养アッセイは (4) に詳記されている。実験的には、PHA- 刺激リン
パ球又は細胞系 (2×10^6 細胞/ml) をウィルス接着後 10 分移却により培養し、37°C で 18 時間インキュベートした。次
いで、細胞を洗浄し、微小培养物 (液体あたり 10~20 カルチャ;
0.25 ml 培養中のカルチャあたり 1×10^5 脱落) 中にプレートし
た。4 日毎に、上清 100 μl を取り除き、新鮮な培地を取り換
えた。次いで、上清を、上記した如き抗原捕獲アッセイにより
ウィルス反応についてアッセイした。既知ウィルス由 (1D-
50) は、培養液の 50% がウィルスに対して陽性を示す濃度のレ
レプロカルとして選択される。

(54) に記載されている如く細胞を予処理してから 30 分間ジュー
ドタイプを添加することによりシードタイプブラークの形成
を抑制した。

シンシチウム染色アッセイ

2×10^5 細胞を、直径 10 mm のウェルにおいて HTLV-III
(55) により感染かつ HIV-I とを產生する 2×10^4 K91 細胞
と一緒に共培養した。培養物を 37°C でインキュベートし、既記
した如く (54, 56) 18 時間後にシンシチウム形成について調べた。
5 倍もしくはそれ以上のシンシチウムを含む細胞を正と判定し
た。培養時に混合培養物に抗-T₄ 又はモノクローナル抗体 (1:
50) を添加してシンシチウム抑制を調べた。

細胞接着光分析及び AIDS ウィルス検査

方針は (46) に詳説されている。実験的には、フルオレセン
素合抗-T₄ 又は抗-T₈ モノクローナル抗体 (OKT^① 4A,
OKT^② 8) を用いる直接けい光抗体法により、細胞表面 T₄
又は T₈ 表現を検出した。密閉/洗浄バッファは、0.1% 血清・

VSV シュードタイプアッセイ

水泡性口炎ウィルス (VSV, Indiana 菌株、野狐型)
上記した如く (53) ホンペロープシュードタイプに必要なレ
フィルスを產生する細胞中で培養させた。高浓度免疫の巾性
核-VSV 血清を調めた VSV に感加して、非シュードタ
ウイルス粒子を不活性化した。シュードタイプ価は 10^4 ~ 11
PFU/ml の範囲であった。アッセイのために、VSV-
ドタイプで感染させる $\sim 2 \times 10^5$ 細胞を直径 80 mm の粗細
ウェルに即入した。H-L, NIH 3T3 及び L929 細胞は
動若性であり、他のタイプの細胞は下層を 50 ヒダ/m のガ
ル-リシンを用いて予処理することにより育蓄した。王時
ウィルスを吸着させた後細胞を洗浄し、各ウェルに 10^5 ミク
CCL84 又は半 ND SK 細胞を添加した。これらの細胞は
VSV 感染のための偶れたブラークを提供するが、シュー
イドビリオンによる感染に際しては耐性を有している。ブ
ラクセル細胞を固定、核酸させた後 (約 90 分)、細胞をホモ
化した。感染後 2 日目に、VSV ブラークをカウントし
既-T₄ 抗体 (1:20)、既-HTLV 血清 (1:10) 又は既-HTLV-1 血清 (1:10) を

(5×10^5) をモノクローナル抗体希釈約 16 μg 中 4 μg で
間インキュベートした。細胞を過心 (800 × g で 7 分間)
り洗浄し、食塩液中 1% バラホルムアルデヒド 0.5 ml 中に
開し、フルオレセンス局起セルソーカ (FACSVN, Beck
man Dickinson) を用いて分析した。既-TLV-1/HTLV-III/LAV 時
ために、 2×10^5 細胞を HTLV-1/HTLV-III/LAV (10 μg) 中
と一緒に 37°C で 30 分間インキュベートした。洗浄した細胞
をフルオレセンス混合抗-HTLV-1/HTLV-III/LAV (16 μg) 中に 4
倍分離並置させた。細胞を洗浄し、1% バラホルムアル
ド中に再懸滴し、上記した如く FACSVN についてアッセイ
既-TLV-1/HTLV-III/LAV 時の初期のために、細胞を抗-T₄
又は T₈ (20 μg 中 20 μg) と一緒に 4°C で 20 分間予備
ケーブルした後既-TLV-1/HTLV-III/LAV (10 μg 中 500 ng
37°C で 20 分間に亘り添加した。細胞を洗浄し、フルオレ
センス混合抗-HTLV-1/HTLV-III/LAV と一緒にインキュベートし
た後、バラホルムアルデヒドに再懸滴し、上記した如く F

ペルオキシダーゼ(18)により過酸化ヨウ素化した(radio iodinated)。 4×10^5 細胞を0.5mM EDTA、 $2\text{mM Na}_2^{32}\text{I}$ 及び28μgのラクトペルオキシダーゼを含むPBS中に懸濁した。0, 1, 5, 10及び15分間に0.08% HgO₂ 10μgを添加した。反応を20℃で実施し、10 mM NaIを含むPBS中で2回透心することにより20分間に反応を停止させた。細胞懸液を4本のチューブに分け、HTLV-III/LAV (20μg中2μg)と一緒に前で30分間インキュベートした。次いで、0~4℃で既凍し、後述した洗浄した細胞を、既凍緩衝液(EDTA; 0.2mMフェニルエチルスルホニルフルオライド、5 mM四アブロチニン、0.2mM EGTA、0.2mM NaF、0.2%オキシコール酸ナトリウム及び0.5% (v/v) ficoll P-40全夜、0.02M Tris、0.12M NaCl、pH8.6) 1mlを添加して溶解させた。チューブを氷上で15分間振盪し、8000×gで20分間透心して液を除去した。

吸収試験用に、ヒトHTLV-III/LAV 15G、ヒト非免疫IgG、抗T₄、抗T₈抗体のセファロース結合物

新規な媒質 (RPMI/10% FCS) で置換した。エイズ感染におけるこれらの試薬の作用を感染5日後に評価した。ウィルス沉降を発現する培養細胞中の感染細胞のフラクションを、上記のように免疫ゲイ充分希釈によって測定した(38)。

RNA抽出及びノーマンプロットハイブリダイゼーション

DNAsを細胞から、4Mのグアニンチオシアンートにてジナイスし、その後5.7M C₂C₁₂クレクションを介して抽出して凍結した(18)。示り(A)⁺クレクションは、オリプ(HT)、セルコースクロマトグラフィー(タイプ3、ニラガレーティブリサーチ(Collaborative Research))によって行なった(29)。RNAを1%アガロース-アルギドゲル(39)上で電気泳動し、ハイポンR(Luerhahn)上に移した。ノーマンプロットハイブリダイゼーションを前述からもたらされた方針に従って行なった。プローブを $\alpha^{32}\text{P}$ ラベルデオキシスクレオチドリボスフェートで比活性 $0.4 \sim 2 \times 10^9$ cpm/微生量にニックートランスレート(coltitranslate)した(39)。

(conjugate)を酵母のようにして凝集した(40)。 λ (lysate)を振拌下1.5時間、200 μlのセファロヒトI IgGに予め吸収させたのち、沈降子3倍セファロース結合物(上記のもの)を用いて免疫セファロース吸収液を、LBで1回、0.5 M NaClで1回、そして0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを含む1日マ1回の合計3回洗浄した。吸収液算1分量、20μlのアンブルバッファー(0.01M Tris 3% SDS、5% 2-メルカプトエタノール(v/v)プロテヌールブルー及び10%のグリセリン(v/v)により溶解した。電気泳動は、8.8~30%のグリセリンの結合グルを含むポリアクリルアミドゲルで行なった。

ウィルス阻害アッセイ

2×10^5 T₄ 1M T細胞を0分にニイズヴィした。阻害剤である塩化アンモニウム(20 mM)、アディン(azanidine)(20 mM)又、ウィルス感染の有(0分、30分、及び30分)加えだ。6時間後、細片

T₄を発現する1%の形質転換細胞を精製することをT₄形質転換T₄プロプラス(該細胞細胞)のら合成されたcDNAを精査内ハイブリダイゼーションし、外縁のドリンクサイトのmRNAから作らライブラリーからT₄をコードするcDNAを原探プローブとして用いた。T₄cDNAクローニングノーマン及びザンプロット分析法により、そしてこれらがクローニングT₄フェノタイプをレシピズ移す能力により判定した。図紙の手順は、先に、T₄をコードしている遺伝子各用意するために用いられテミジンキーティ(1K)欠損マウスと細胞を、プラスミド、cTK(2S, 3S)に沿ってT細胞白血病HUT-112からゲノムDNAと共に形質転換した。T細胞の表面タンパクを免疫するK⁺ T細体は、体内でのロゼッティング(resetting)分析に用いられK⁺クローニングを行った。対するマウスモノクロ

1つの一次 T_4 形質転換体、LT D-4を保た。このクローニングによる T_4 分子の表現は、サイトフルオロメトリック (cytofluorometric) 分析により、独立に確実にした (図1)。

T_4 形質転換体、LT D-4 の mRNA 分析は、新たに形質転換された遺伝子の発現においてのみ、非形質転換 LT 細胞のそれと異なるはずである。これらのレーザンスは、非形質転換 T_4 (32, 66) からの大過剰の RNA と共に T_4 形質転換体のより (A) mRNA から調製された高濃度にラジオアクティビティが cDNA をアーナーすることにより確認される。高ニット (R0) においてはハイブリダイズできない cDNA をヒドロキシアルタイトクロマトグラフィーにより差別し、*Jebabu* クローンベクター-8110 中で調査されるセト外線 T 細胞 cDNA ライブライヤーをスクリーニングするのに用いた。4つの弱いハイブリダイズマーク (hybridizing plaque) が固定され、ブラーク精選され、 T_4 シーケンスの存在について分析された。

これらのクローニングのどれが T_4 をコードするか決定するためには、 T_4 と T_4 外縁 (peripheral) T 細胞、白血病細胞、細胞細胞、細胞形質転換体及び非リンホイド (nonlymphoid) 白血病を用いて、ノーマンプロット分析を最初に行なった (図2)。

図2。4つのクローニングうち1つは、 T_4 表現中にのみある RNA にハイブリダイズした。このクローニングは T_4 転換体、LT D-4 中に存在する 3 kb RNA を検出し、また T_4 外縁リンパサイト、多能の T_4 白血病セルライン及び腫瘍細胞のポピュレーション中に存在する。非形質転換プロクラスト、 T_4 外縁リンパ細胞、Hela 細胞、おなじくトニニアプロクラスト (neuroblastoma) 細胞からの RNA ではハイブリダイゼーションは認められなかった。

このクローニングにより検出される RNA の発現パターンは、何が? をコードしている可能性と一致する。しかしながらこの cDNA は単に 0.6 kb の長さであり、3 kb mRNA をハイブリダイズする。従って、ヒト外縁 T 細胞 cDNA ライブライヤーを再スクリーニングし、3 kb インサートを含む1つのマーク (pT4B) が現れ、このものはサイズ的に成熟した (mature) メッセンジャー RNA に近似していた。このクローニングの制限塗り (restriction map) を図3A 図及び図3B 図す。

ゲノムプロット分析

サテンプロット実験 (33) を次に行ない、中性した cDN

クローニングがヒト DNA と同様に T_4 形質転換体からの DNA とハイブリダイズし、非形質転換マウス T 細胞 DNA とはハイブリダイズしないことを明らかにした (図4)。様々なヒト細胞からのゲノム DNA は、*Bam*H I酵素での酵型の後、5つのハイブリダイズしたフラグメント群を示す。予期されたように、 T_4 シーケンスが形質転換体、LT D-4 中に検出することがあるが、非形質転換マウス DNA 中には検出できない。遺伝子 (6 kb) の 3' 端部に最も近い *Bam*H I フラグメントは LT D-4 中に存在せず、恐らくインテグレーションインベントの結果と思われる。さらに、リンパ球及び非リンパ細胞からの DNA と比較すると、このような粗い分析レベルでは、全体の再配列は明らかではない。ハイブリダイズしたフラグメントの分子量の合計は約 6 kb であり、 T_4 遺伝子が大幅大きいことを示唆している。この領域をスパンするゲノムクローニングの完全なセットが得られ (下記参照)。*Bam*H I フラグメントはこれらのクローニングの制限分析によって狭域化され、遺伝子が大きく

出発した cDNA が T_4 をコードすることは、まさにこのクローニングが形質転換の後、該構造細胞を T_4 フェノタイプ化しうるかどうかによって実証される。染色体 DNA 中の遺伝子は大きく、さらにつくつかのゲノムクローニングにスパン (span) する。従って、cDNA クローニングを 2つのレトルス鳥翼ベクター、pYcos 7 および pMV6K t /neo 入する。これらのベクターは、单一の EcoRI クローニング位の側にあるセロニーマウス白血病ウィルスの長いヌクレオト (LTR) を含んでいる。5' - LTR はクローニングしての転写を促進し、3' - LTR は M 型及びボリニレーショーンに必要なシーケンスを含む。ベクター pMV /neo はまた、ネオマイシンホスファトランスクレターゼのコード領域に融合した L プロモーターを含んでいる。pYcos 7 を用いる構成物 (construct) は市販結合選択性と共に形質転換することを必要とする。一方、pN /neo は、結合 (fusing) 形質転換を許容するネオマイ

出するニセッティング法を用いてスクリーニングした。

pVc08-7で供されたG418コロニーの約50%及びpMV61k^r/neoで供されたコロニーの約50%がこのアッセイです。について陽性であった。ロビート細胞コロニーをさらにサイトフルオメトリーで分析して、T₄^rが形質転換細胞の表面で発現されていることを確認した(第1図)。

代謝タンパクラベル実験を行ない、T₄^r形質転換細胞細胞及びアリンバ細胞が同一の分子量のT₄タンパクを発現することを明らかにした。非形質転換NEH3T3細胞、T₄^r形質転換細胞及びアリンバ細胞をレ-[³⁵S]-メチオニンの存在下に32時間ラベルした(41)。これらの細胞を洗剤で可溶化し、浴好物(lysate)をレンズ豆レクチンカラムに通して純タンパクを精製した(42)。結合部タンパクフラクションを溶離し、T₄^rに対するモノクローナル抗体で免疫沈降(immunoprecipitate)させた(第2図)。遠心条件下、相対分子量51kDaで分離するタンパクを、アリンバ細胞と2つの独立したT₄^r形質転換細胞からの抽出物中で検出する。このタンパクはコントロールであるNEH3T3非形質転換細胞中では検出されない。非遠心条件下では、51kDaタンパクが、丁細胞中及び形質転換細胞中で見

T₄^rにより免疫検出される。

これらの実験から、形質転換細胞が抗T₄によりT₄形質転換細胞を免疫し、このものはサイズ約80kDaの蛋白質で説明されるものと同一であることが明従って、此種のDNAsを用いるノーザン及びサザニエット法によるT₄フェノタイプをマウス天竺鼠脾細胞のDNAsの能力の因数の結果は、T₄形質転換細胞全てのコードレーケンスがクローニングされたことである。

3. cDNAのスクレオチド及び構造タンパクシ

T₄コード領域の既知スクレオチドシーケンス測定法(terminal block method)を用いて、386のコード両方のストランドをシーケンシングすることとした(46, 48)。完全スクレオチドシーケンス及シーケンスモードを第3図に示す。最後のオープン読みは、開始コンセンサスシーケンスPurNNATで成り立つられたメチオニンコドンを有するも部である(49)。この紙上版リフレーム(reading frame)オフセットに反し、134アミノ酸を含むポリペプチド

である。この読み取りフレームの座標は、このcDNAをRNA表現ベクターpSP64にインサートすることにより確認した(41)。このベクターから合成したRNAは、生体内で翻訳された場合、非修飾(unmodified) 51kDaタンパク(スクレオチドシーケンスから予測された正確な分子量)の倍に各充配する(第7図)。

(以下省略)

T₄は、リーダー配列、4つのタンデム可変-1型領域、及び側鎖置換領域から成り、各部分はイム・遺伝子簇(62, 63)の異なる構成メンバーとの対応関係を有している(第6及び8回参照)。Xyle-Br酸水性プロットにより予測されるリーダーペプチド水性基の一時(sitochron)は、開始コドンの直後である。天候T₄タンパクがプロセス起始される位置することができないが、既知の翻訳パターン(5E-1位基のスレオニンの直後で剪断が生じるもの)を考慮して、シグナルペプチドは23個のアミノ酸であり、プロセス処理されたT₄は415個の残基からなる。

成熟タンパクの1-94残基部分は、イムノゾブ抗体とアミノ酸及び側鎖上の相間性を有している。またイムノグロブリン可変領域とこの領域との全体的同一性は、約50%である。

度と同様にイムノグロブリンレボルバ酸性分子に見出される対応部分に類似している(61)。これらのシメティンはV領域に導入的かつ存在されている間にジスルフィド結合を形成することができる。この予想は、通常条件下よりも非還元条件下での方がT₄の移動速度が大きいこと、これは少なくとも1つの結果が存在が示唆されていることを意味する、という我々の既報結果によって、支持されるものである(第5回、図5及び6)。

個々のアミノ酸レベルにおける相間性以外にも、T₄のV領域はイムノグロブリン可変領域と導入的な特徴を共有するものである。イムノグロブリンの可変性び不変領域は、連続する既往ターンが折りたまれて2つのターシートを形成するという特徴的なパターントで折りたまわれている(61,68)。これらのターシートは、ジスルフィド結合及び側鎖的水素結合作用の両者によって、一緒にになっている。T₄のV領域がイムノグロブリンレボルバ酸性分子と2次構造上でどのような相間を有しているかを決定するために、二次元構造アライメントを行った。同時に、これらの配列における予想可能なターン及びターンのプロットもCleu及びEudaaの既報的に示されたアルゴリズムを用いて行った。これらの分析によつて、T₄のV

において、統計的に重要な配列であつてイムノグロブリンV領域の二リペチドに導入的相間性を有する、三つの附加V₁の領域に導入的に分けることができる266 種のアミノ酸配列がある。第6及び8回参照。更に、この領域には、N-結合アクリコニル化部位が二つ存在する可変性がある(A₁₂₂-L₁₂₄-T₁₂₅; 第6回)。

和頭外領域に在いて、疎水性プロット(66)による予測で可変性のある既往性(既往性)配列があり、この配列は、疎水性及び中性アミノ酸残基のみを含むものである。このセグメントは、五型主要組織適合抗原タンパクの既往性エクソンと極めて同様性が高い(第6回)。これらの配列を並べて比較すると、ギャップなしに89%の相間性が認められる。この既往性セグメントに対して、60個の高活性アミノ酸側鎖交換率を検討する(第6及び8回)。

T₄遺伝子：染色体座標及びイントロン-エクソン配置

マウスと人において、そのマカストヒト塩基配列ハイブリッ

合体内に存在する3つのB鎖の存在はイムノグロブリンV領域内に見出される対応領域と非常に良く一致していることがある。第9回参照。T₄の保存された3つのシテインはS₁及びS₂内にあり、イムノグロブリンの既往性ジスルフィド結合形成することが知られているV領域内のシテインの位置と確に合致する。第1のシテインの12個アミノ酸分下流に1プロトアランがあり、第2のシテインの2個アミノ酸分前にチロシンが位置する。これらの残基は、上記V領域のB鎖(及びDに及ぶ)非常に特徴的なものである。更に、アスパルテ酸基が第2のシテインの6個アミノ酸分上流にあり、アラニン残基はS₁鎖Dのベースに位置する。これらの荷電残基が領域に非常に特徴的なものである。最後に、疎水性残基がS₂をうじて交叉に存在しており、これによつて、二つのB鎖の相互作用が強化される。

T₄ウツ1既往の後には、イムノグロブリンの場合(J)及びTセルは屈レセプターと重要な相間性を有するアミノ酸基が続いている。第9回において、このT₄ V領域は、ノグロブリンのし崩のコンセンサス配列及びTセル抗原プロターの二つの組合せを記載してある。このT₄遺伝子

16-3114ハイブリダイゲーションによつて、T₄遺伝子が融合体12の近傍、12p12及び12q12cの間にあることが証明された。既往子を有する雄性ゲノムクローニング組を、ラムダクニシングベクター-cherry及びE.coli B-3(31)内に構築され、ヒトゲノムライプラリーをラジオ活性化T₄B cDNA端までスクリーニングすることによって得た(70)。これらのクリークの特徴は、固形断面及びサゲンプロット分析によつて明らかにされ、全T₄コード既往が合成されていることが判明した。ゲノム停止法を用いて、ゲノムクローニング終了位置を配列決定することによって、T₄遺伝子の完全なインストロンエクソン構造が決定された(85,86)。

第8及び10回に示したように、T₄遺伝子は、8つのインストロンによって分割された9つのエクソンから成る。第1のエクソンはS₁既往性既往及びリードセグメントを含む。第2のV領域V₁は既往性B9に位置する大きなインストロンによって分割されている(第6回)。従って、V₁, J₁領域は、

表平2-5

(Cドア)は、インtronによって分断され、この細胞の最後の部分は3'非翻訳領域とともに第9番目のエクソンにコードされている。

丁々及びて、形質標換取扱の構築

AIDSウィルス感染におけるT₄の役割に関する研究において、最初に用いられた実験手法は、ウィルス感染を防ぐことのできないT₄細胞系内にT₄連三次元を導入することから成る。こうして得られた形質転換細胞はAIDSウィルスに対する感受性について比較し、次いで、T₄がウィルス感染を媒介するメカニズムについて研究した。

アミノ酸配列をコードする全長 cDNA クローンをレトロウイルス表現ベクター、pMVA7 にサブクローン化した。表現ベクター pMVA7 (第 113 図) は、様一足式コロニーニング部位を有する二つの構造に又復される。モノニーケスキミナルニーマウイルスの LTR (long terminal repeat) を含有している。5' -LTR はクローニング部位をこうじて構成的 (cohesive) に転写を通過し、一方、3' -LTR は RNA の切断及びポリアデニル化に必要な配列である。更に、pMVA7 には、細胞ホモセレンホスホランスフェラーゼ遺

で培殖し得る能力を有するN-60・細胞ニロニーを連続し、
In vitro ロゼット形成アッセイを用いて細胞表面上のナムル
についてスクリーニングを行った(20,70)。T₄を発現してい
る形質転換細胞-2細胞は、10⁵ cfu/mlの力値で粗挽えレトロウ
ィルスを産生するものとして同定した。この下、T₄-M-2ク
ローンは既にマウスターへM細胞感染することでのさもレトル
ティルスを生み出す為に使用された。粗挽えレトロウィルスを
10⁴ cfu/mlの力値で産生するT₄を現現の-Mクローンを単純
化した。T₄ヒト形質転換体は、マイタマイシンC処理又は
-AMクローンとの共培養(cocultivation)によって得られ
た(図15図)。T₄形質転換体は次いでノーアンプロット
分析にかけ、フローライトメトリーによつてT₄が発現されて
細胞表面に存在していることが確認された。T₄表面タンパク
を発現するコントロール細胞系も同様の方法で印製した。

位子 (n = 6) のコード領域に脅迫したヘルペス・ジンギナーザプロモーター ((L))、ドミナンテが含まれており、其形質転換及び感染をリンクさせることを可能にしている。

T₄ - P M V 7 は、夫々、欠損自己細胞毒性及び
(anabolropic) プロヴィルスを含む (4, 48) 、ウ
A M 细胞、及び N I II 3 T 3 細胞系に導入された
既。細胞死は、内因性ウィルス又 N A のチャフ
(enveloped virus) を起こさせることは出来なかつ
全てのトランスウィルス遺伝子を提供し得た。T₄
よろこへら細胞株の安定した形質導入 (トランス
によって、ヘルパー・ウィルスフリーの T₄ モニ
トロ・ウィルス・ストックの生産が生なされた。これ
ルス・ストックは、次いで、マウス及びヒト細胞に
ルスの標的細胞による生産なしに、T₄ 正列を始
るために使用された。

高率に述べると、DNA-導入過程は
- pMV7 DNAを λ -2細胞内に導入した(27)。キヌマイシンアナログG418 (Geneticin)。

て、H.S.B.2の感染症に対するA.I.D.S.ウイルス感染症は、たゞ11のものが実際に発見するものを採集した。日本ではT.のいがれも発現せず、三陽院祝賀レマブT.、タンパク板台位のいがれをも発現しない。T.シバクを発現するH.S.B.2の形質転換体を選択し、ウイルスに対する感受性について決定した。A.I.D.S.を評議するためには、いくつかの異なる実験手法があり、例えば、逆転写酵素の発現(52)、イムノフルオレシスコピーやによる細胞質内におけるフィルス抗体アッセイによる培養上清中のウイルス抗原の検出、トペナゲルチニン【ロットス】-剝離技術リソバジベホート(tube-nate)サプカルチニアによる早期型(+)などが挙げられる。これらのアッセイを用いてH.S.B.2細胞系のA.I.D.S.ウイルス感染症は、たゞ1例(表1)。

表 1

AIDSウイルス中和における「E」・ヒト細胞培養の基礎

ヒト細胞	過剰抗原	細胞マウス	細胞マウス	細胞	HSV(ELISA)	シードタイプ	ウイルス結合
	(Sarcoma)	ウイルス	原代細胞	細胞	感染	感染	
CE(T ₄)	DS5073	-	-	-	-	-	-
HS39	4243	-	-	-	-	-	-
HTLV-I ₆	4409	-	-	-	-	-	-
HS38-T ₆	190915	-	-	-	-	-	-
Raji	HD	HD	HD	HD	-	-	HD
Raji-T ₈	6595	-	-	-	-	-	-
Raji-T ₄	101500	-	-	-	-	-	-
HeLa	6438	-	-	-	-	-	-
HeLa-T ₈	4575	-	-	-	-	-	HD
HeLa-T ₄	48125	-	-	-	-	-	-

5×10⁶ 細胞にAIDSウイルスを接種し、17℃で24時間インキュベートし、洗浄して細胞培地に再プレート化した。細胞及び浮遊物を3, 6, 9, 12, 18, 24, 48及び72日に取り出し、各細胞のウイルス検出アッセイに使用した。細胞、細胞培地、細胞液ウイルス、浮遊液ウイルス並びに浮遊物を当量である。

シードタイプを記述する場合は次のようになります。⁺(210³ PFU/ml) : - (10RFU/ml) : ND : 不定せず

さらに、AIDSウイルスに対するレセプターを有する細胞ヒト細胞をAIDSウイルス産生細胞と共に若葉すると広範囲な細胞融合が起こることが以前に示されている(EI)。このアッセイにおいては、HTLV-I及びHTLV-II産生細胞により多量のシンシチウムが生成されているにもかかわらず(データは示していない)、HSB2細胞をAIDSウイルス産生細胞と混合した場合シンシチウムの汚染は起らない(表1)。最後に、AIDSウイルスのエンベロープ糖タンパクを有する小胞状膜性ウイルス(VSV)のシードタイプ(pseudotype)を使用して、ウイルスの侵入(entry)を試験した(表1)(53,54)。AIDSウイルスに感ぜた細胞をVSVにより感染すると、高度免疫抗VSV血清による中和に抵抗するのに充分なAIDSウイルスエンベロープ糖タンパクが一部の子孫(progeny)VSVにより漏るれた。これ等のVSV(AIDS)シードタイプビリオンの宿主細胞は、AIDSウイルスに特異的なレセプターを発現する細胞に局限

VSVが近くのVSV(AIDS)シードタイプ感染に影響を示す細胞細胞(ミニクCC-L64またはウルM-D-B-K細胞)に侵入し、吸収する。その結果得られるVSVブラークの数をカウントする。このようにVSV(AIDS)シードタイプの感染により、ウイルスの侵入の対象的細胞病原(cytotoxic)ブラークアッセイが得られる(55)。このアッセイにおいては、HSB2細胞をVSV(AIDS)シードタイプにさらした場合、バックグラウンドに対するブラークが測れなかった(表1)。HTLV-Iエンベロープ中にシード化されたVSV RNAのシードタイプ(VSV-HTLV-I)による外因実験では多数のブラークがされ、これはHTLV-Iレセプターを有するHSB2細胞VSVを効率的に吸収できることを示している。これ等の細胞、AIDSウイルスエンベロープ中にカプシド化されたVSVやVSV-HS2細胞中に侵入できないことを示す。

AIDSウィルスにさらすと、当細胞系毒活性の強度により（52）、免疫監視細胞による細胞の自己覚察のウイルスの発見により（40）、イムノアッセイを使用しての培養浮遊物中のウイルス抗原検出により（41）、そして為HIV前駆リンパ球との接種（supernatant）の結果による感染性ウイルスの検出により（表1）（46）測定される。有効なウイルス感染が生起する。对照HSB2-T₄細胞はそれぞれのアッセイにおいて一致して陰性であった。

さらに、異なるT₄細胞がAIDSウイルスに感染される効率も測定した。HSB2-T₄及びHSB2-T₁、即ち免疫抗体、天然に出現されたT₄細胞CEM、並びにPBLA前駆末梢リンパ球を、逆説的に10倍希釈したAIDSウイルスにさらし、洗浄し、ソレート化して吸収培養した。ウイルスに対する陽露後18日に、イムノアッセイを使用して感染度を測定した（表II）（43）。このようにして、さらしてた培養の50%を感染されるのに必要なAIDSウイルスの効率（ED-50）を決定した。PBLA前駆末梢リンパ球のED-50は、次第に増殖されたものあるいは形成したT₄細胞系について見られたものの2~3倍の大きさである。HSB2-

T₄細胞の感染効率は、天然に出現されたT₄CEMについて見られたものより約10倍高い（表III）。HSB2-T₄細胞は、弱く最高のウイルスも感染に対して非感受性である。

レンシテラム形成及びVSV(AIDS)シャ族細胞の既持するHSB2-T₄細胞の培養すると、18時間以内にレンシテラム形成がみる（表I及び表II）。またに、シンシチウムを導入するT₄モノクローナル抗体で前処理することによ（表II）。そしてHSB2-T₄細胞をVSVシェードタイプにさらすと、感染VSV粒子が多くの細胞各領域する（表I及びIII）。さらに、既AIDSウイルス抗体または既AIDS抗体による解吸により阻害される（表III）。対照T₄細胞は、AIDSウイルス感染の検出用アッセイのそれぞれにおいて、一貫して陰性であつ（表II）。これらの観察は、ヒト未成熟Tリシンバ（タンパク）が既に存在することがAIDSウ

型の本質的構造をもたらすという進歩学的証據を与えるものである。

表 II

T₄ヒト形態新規体におけるシンシチウム形成

シンシチウム深透

ヒト細胞	HS/AIDS	HIV/AIDS + αCTeA
SH(T ₄)	+++	-
CEM(T ₄)	+++	-
HSB2	-	ND
HSB2-T ₀	-	ND
HSB2-T ₄	++	-
Raji	-	RD
Raji-T ₀	-	ND
Raji-T ₄	-	ND
口咽	-	ND

(H9/AIDS)と共に培養し、37°Cでインキュベーション後にシンシチウム形成について培養を調べシチウムに含まれる既の粗算パーセンテージでシチウムなし；++(20%)；+++(50%)；+++；++++(測定せず)。シンシチウム阻害は、既T₄ナル抗体(c.T₄A; 1:20)を培養時に混合均一化した。天然に用離されたT₄細胞系HSB2の研究の陽性コントロールとして使用した。

特表平2-503260(2)

2×10^6 個/ml VSV (AIDS) シュードタイプ (53.5%) 方に 2 時間 37°C でインキュベートした。次に細胞を洗浄し、 $\times 10^6$ ミンク CCL84 またはウシ RDBK ブラーカー細胞を各ウェルに加えた。これ等は VSV 感染を許容するが、V (AIDS) に対して抵抗性である。培地を滅死培地で保ち、2 日後 VSV ブラーカーをカウントした。抗 T₄A をモノクローナル抗体 (HTLV-A : 1 : 20) または抗 AIDS ウィルス抗体 (AIDS : 1 : 10) を使用してシュードタイプ (53.5%) 86 分前に細胞を前処理することにより VSV (AIDS) シュードタイプ ブラーカー形成を阻止した。広範囲な種類の細胞型 (54) 上にプレートする VSV (HTLV-1) シュードタイプをこれ等の実験の対照として用いた。VSV (HTLV-1) シニードタイプ ブラーカー形成を阻止する Ig - HTLV-1 血清 (1 : 10) を用いた。結果は PPD と ND (飼はせず) で示す。

(以下余白)

AIDS ウィルスの感染は T リンパ球へのみに制限されない。既往生 T₄ cDNA を 2 種のヒト T 细胞系に導入した。即ち、子宮癌に由来する上皮癌細胞系である HeLa (12) 及びバーモントリンパ癌の細胞系である B cell (13) である (第 1 図)。レトロウィルス成分の遺伝子転写の前は、これらの細胞系は表面 T₄ プロテインあるいは T₄ mRNA を発現せず、AIDS ウィルス感染に対しがんばりではない (図 1)。さらに細胞系はシンシナケムの誘導及び VSV (AIDS) シュードタイプのブレーティングを維持しない (図 1, 3 及び 5)。

これに対し、T₄ B cell 及び B cell 形質転換細胞は、前記した全ての基準により AIDS ウィルス感染を開始した (図 1)。

次に T₄ T₄ 細胞が AIDS ウィルスに感染される効率は、HSB2-T₄ の場合とはほぼ同様であり、天然に感染された T₄ T₄ T₄ CEM の感染の効率の約 10 倍高いものである (第 12 図)。さらに、AIDS ウィルス感染 T₄ 細胞との共培

れ等の細胞を VSV (AIDS) シュードタイプにさらすと既存の VS が產生され、ブラーカーが形成されるが、これは AIDS ウィルス抗体又は抗 T₄A もモノクローナル抗体前処理による阻止される (図 1 及び 5)。対照の HeLa 及び HeLa-T₄ 形質転換細胞はこれ等の測定のそれぞれにおいて一致して陰性である (図 1, 3 及び 5)。

次に、複数個 T₄ 遺伝子のヒト T リンパ球、B リンパ球あるいは上皮癌細胞への導入は、これらの細胞を AIDS ウィルスに感染するに充分なものである。まとめると、この系統は in vitro で被感染される T₄ T₄ T₄ の特徴は子の細胞にされた発現の結果であり、それが表現された細胞性ではないことを示している。

(以下余白)

特表平2-51

AIDSウィルスは表面T₄を自己反応結合する

前記の実験はT₄先端がAIDSウイルス感染に必要とされる活性的部位を示すが、ウイルス生合成におけるこの分子の役割に関する知見は与えない。T₄の表面先端がAIDSウイルス感染に必要であるという観察は、T₄がAIDSウイルス表面体であることを示唆している。従ってT₄及びT₈形質転換体ヒト細胞の表面に対するAIDSウイルスの結合を吟味するにはクルオロサイトメトリーが使用された（第14図）。HSB2-Ro3⁺及びRo3a細胞は、並びにT₄⁺又はT₈⁺形質転換体をAIDSウイルスと共に培養培養した。ウイルス吸収に次いで、細胞を洗浄し、フルオレセイン共被した後AIDSウイルス抗体に曝露して、フローサイトメトリーにより解析した。この試験によりAIDSウイルスは表面T₄を先端するヒト形質転換体には有効で効率的に結合するが、T₄⁺細胞にT₈⁺形質転換体にも結合しないことを示した（第14図右側、表1）。AIDSウイルスのT₄⁺細胞に対する結合は抗T₄モノクローナル抗体との培養培養により阻止されるが、抗T₈モノクローナル抗体との子孫培養では止められない（第14図、C図）。次に、T₄⁺形質転換細胞

をAIDSウイルスに曝露するはあい、T₄表面エペルベロップ（envelope）蛋白質と共同結合するのではこれらの分子間の直接の物理的結合を示唆してもさまい。これらの結果はAIDSウイルスのT₄分子に結合することと、この結合は呈現したすべての型に生じるのでT細胞特異性の他を関係であることを示している。

以前の研究では吐き込まれたウイルスについて進入途径が記載されている（14,15,16,17）。若干の形質転換細胞と直接結合するものがあり、そのスクレオ酸質中に露出するのであって、その様ウイルスの蛋白質仲介のエンドサイトシスにより取り込まれて膜、エンドソームの酸性環境は液滴の細胞質との融合を容易にする。細胞内体途径を経由してウイルスによる感染は、エンドソームから脱離するため用いて細胞を処理することによって抑止される（58,78,79,80）。酸化アンモニウムの存在でム中での結合が遮断されるがリソソーム低下ではなくまで逆行する（80）。

かような証でT₄⁺T細胞系IMのAIDSウイルス感染に対する酸化アンモニウムの影響を検証した。酸化アンモニウムのないはあいは、AIDSウイルスに曝露したIM細胞の50%以上が、感染後2日でウイルス抗体を発現することは先端先端細胞により創立された通りである。ウイルスの添付時又はウイルス添加後30分以内かのいずれかで、T細胞を酸化アンモニウムは（6時間）曝露するはあい、ウイルス感染の93%より大きな阻害が認められた。しかし、ウイルス添加後1時間で細胞を酸化アンモニウムで処理したばあいは、感染の阻害は認められず、蛋白質仲介のエンドサイトシスを経て細胞に入るウイルスに対し記載したウイルス侵入の途従と一致する現象であった。結局、酸化アンモニウム効果は完全に可逆的であった。酸化アンモニウムに1時間曝露した後、洗浄により同化合物を減くしてAIDSウイルスに曝露した細胞は、ウイルス性感染の初期永続性を示した。これらの現象は、酸化アンモニウムによるウイルスの初期永続性を示す。

これらの結果は、T₄-AIDSウイルス蛋白質シトシス及びエンドソーム膜界面とのウイルス結合してかかわり、細胞の細胞質中にウイルスアシドを放出するウイルス侵入の機序と結合す。

T₄マッセンジャーRNAは膜で発現される細胞免疫系統の破壊に初めて、AIDSがしは、中枢神経系（CNS）障害であって、それはウイルスによる脳細胞の変性感染の結果と考えられるがCNS内の細胞に発現し、これによりウイルスの説明を提出するかどうかを決定することに加T₄ mRNA配列がCNSに発現するかどうかを検討とマウスの両方の脳から調査したRNAのリバート解析を実施した（第15図）。ヒト大脳灰質（H）⁺RNAはほぼ3及び1.8kbの分子量を持つT₄mRNAを含む（第15A図）。より長い3'末端のRNAが細胞質で発現するが、これは細胞

性的スプライシング又は代替の5'又は3'端から生成することができた。

T_4 mRNAの存在の更に微量な解析はマウス脳の特定領域からボリ(A)+RNAを増幅することにより実施した(第158図)。 T_4 のタヌミ相同期であるし、 T_4 を記号化する放射性探査とDNAによるハイブリッド形成は、該脳試料には存在しないマウス前脳中の強度の1.2kb RNAを明らかにした。2.9kb L_8 T_4 mRNAは皮質、視床下部に検出が可能で、頭状体にもっとも豊富にあるが、小脳、脛幹、又は脊髄には存在しない(データは示さない)。CNS中に検出される1.2kb mRNAは胸腺細胞中のし、 T_4 を記号化する3.2kb mRNAよりも小さく、約1.6kbである(第158図)。これらの結果は、AIDSウイルスが抱持する内因性が複数に及ぼす T_4 分子の表面表現の結果と思われる。前脳で検出されるmRNAの丰年は胸腺細胞中の丰年の約1/100である。このことは大多数の細胞による低丰年の発現又は小さい部分集団の細胞による比較的高丰年の発現を反映するとともいえる。 T_4 が神経細胞又は支持細胞により発現されるかどうかは現在知られていない。しかしながらCNS中の異形転写体(variant

genotype)は領域は、構造的に既存しているけれども、それらが構造的異なるサブセット上の異なる分子を認識するという仮説と矛盾しない影響のある配列相違(divergence)を示している。

T_4 及び T_8 のN-末端領域によくて共用されるV-領域は構造的相同部分は、これらの蛋白質の構造に特に関連したものであるかも知れない。免疫グロブリン由来子系抗体の実験的すべての能性は、免疫応答に由来している(12)。更に、この系抗体の個々の領域は互いに強力に結合して二重体を形成する傾向を示す。この場合に免疫グロブリンの脂肪と軽鎖、T細胞抗原リセプターの鎖とB鎖、 β_2 -ミクログロブリンとクラスI MHC蛋白質、並びにクラスII MHC分子の鎖とB鎖の相互作用において明白である。 T_8 死後蛋白質は、接尾された膜分子である T_8 と胸腺細胞表面でジヌクレオチド結合を形成し、また末梢Tリンパ球上の3種類のサブユニットの多価体として存在している(83)。 T_4 の4つV-領域の存在は、

transcript)の存在は、既に T_4 mRNAが多少量入T細胞により発現することを窺らしくしている。

結論

T細胞の機能的に別個なサブセットを用いる T_4 及び T_8 分離はこれらの分子が適切な細胞表面とアッセンブルの相互において重要になり得ることを示唆している。これらの蛋白質的性質を理解する第一歩として、cDNAをクローニング及び T_4 及び T_8 の両分子について組成され、それらの構成性配列が決定された(26, 70)。 T_4 及び T_8 の構成した蛋白質配列は、これらの分子が免疫グロブリン可変(V)ドメインを持ち、且つ免疫グロブリン超遺伝子系統群(supergene family)の構成員としての構造配列と細胞表面の相同性を共有する事を示している。しかしながら、 T_4 及び T_8 のN-末端V領域は全く異なる。すなわち、これらの分子は免疫グロブリンを共有しているに過ぎず、既って各分子の免疫グロブリンに対する相対性よりも分子相互の相同性の方が低い(図)。更に、 T_4 と T_8 との間には大差(conservation)域はまた免疫グロブリンに対する最も強力な結合領域及び隣接セグメント領域である。故てこれらの二つの分子

にとって重要であるのかも知れない。

T_4 の進化

免疫グロブリン及びT細胞抗原レセプター遺伝子においてV及び λ ニクソンは広く分離され、体細胞の相換エイボン(somatic recombination event)の後にのみ、合成されるになっている(68, 83)。 T_4 mRNAは、DNA相換イベントを必要とすることなく、足続的(contiguous) V-鎖及び構成要素を4つコードする。従って、 T_4 は構成要素($\gamma\delta\alpha\beta\delta\gamma\delta\gamma$)メカニズムの発生初期に共にいたより原始遺伝子を反映している可能性がある。このことはさらに、 T_4 のV-鎖領域(V1)が、免疫グロブリンもしくは胸腺細胞リセプターのいずれかをコードするV遺伝子中に存在しないイントロンによって分離されているという事実の如見によって支持される。イントロンが进化過程で任意ではなく開かれ、及び、イントロンが以前にはイントロンのない環境中に含まれることは極めてありうることであるということは、既に

ファミリーを形成したと考えられる。現在の極めて複雑な免疫学においても推進しているが、 T_4 はより原始的な細胞系免疫学において機能するレセプターを反映しているであろう。抗体産生能のもののように、固有的免疫応答は、レセプター分子の構成レパートリー (*diversity repertoire*) を含まないと考えられるが、最も単純な場合には、自己及び非自己の間の区別に限定され (55,56) 、さらに再配列を起こさない「固有的」遺伝子群によって説明されると思われる。

進化時に T_4 の出現の順序がどのようにであれ、この遺伝子の構成はニクソン組合 (*shutting*) の意味深い例を示している。 T_4 は多くのリノン球領域から成っており、1) 壁膜及び2) 脳膜セグメント (*transmembrane segment*) は、スーパー遺伝子ファミリーの複数のメンバーでの相同性を含み分け合っている。V-及びJ-領域は、免疫グロブリンと細胞膜原レセプターの両方の指向する領域と相同である。壁膜領域は、クラスII MHC分子のB-鎖におけるこの領域とかなりの相同性を示す (第30図)。先づ、 T_4 は免疫グロブリンのスーパー遺伝子ファミリーのいくつかのメンバーにおいて保存されたエフェクソングの喪失から成っており、この遺伝子ファミリーは異なった

様式で混合されて、免疫応答に関与する種々の多くの疾患である。

3.4 AIDSウィルスレセプターである

本明細書で提出したデータは、生ず細胞表面におけるAIDSウィルスと T_4 分子との特異的結合を伴うAIDS感染のメカニズムを示す。この命題は、Tリンパ球、B細胞及び上皮細胞において証明された、従ってT細胞 T_4 ベクタの関与を必要としない。更に、本明細書に提出するには、 T_4 -AIDSウィルス複合体はレセプター由来のトーションによりインターアリネーションされ、次にエンドベロープはニンゾームの封喉膜と融合し、ヌクレオシドを細胞質に放出することを示す。ウィルス複合体は、リンパ球及びホリントバウム細胞の两者ではこりT細胞では逆にT細胞にリンパ球において発現し、AIDSの二重免疫能 (dual neutropole) 及びリンパ球 (lymphotropism) 様性に対する一つの説明を提供する。一方において、特に T_4 領域の選択に対するAIDSを検討するため、エフェクター細胞-目的細胞の介するのに優れたTリンパ球表面タンパクが、ヒ

イルスによって利用してきた。

動物疾患レセプターは多数のニンベローピー・ウィルスについて同定されてきており、しばしば宿主の範囲及び特定ウィルスの指向 (*tropism*) はこれらのレセプターの発現のパターンのせいである (14,16)。あるウィルスはごく狭い範囲の細胞タイプに感染し、種的細胞の特定細胞に由るウイルスレセプターの発現に依存する。例えば狂犬病ウィルスはニコチン型アセチルコリンレセプターと相互作用し、骨格筋と心臓に大きく感染する (87)。ところがEBV (*Epstein-Barr*) ウィルスはC3d結合レセプター-タイプ2と相互作用し (18)、Bリンパ球に感染する。ミクソウイルスのような他のウィルスは細胞表面に感染する。シアル酸残基と相互作用し、より広範囲上に発現するシアル酸残基と相互作用し、より広範囲の細胞タイプに感染する。

細胞表面レセプターの記載された発現は、ウィルスの指向に対する唯一の認明を提供する。あるウィルスは、分化した細胞タイプの割取された1つのセットにおいてのみ復製する。従つ

て白血球を説明する (59,60,61)。この指向は、Tリンパ球のMuLVゲノム及び赤血球表面のFr-MuLVゲノムの発現を促進するとしてR3ににおける前述の結果と想われる。本明細書に示したように、AIDSウィルスの一つの因子は細胞表面の表面に含む T_4 リンパ球の発現T細胞表面細胞及び骨髓幼稚細胞及び樹突細胞への *in vivo* に示される。3つの原因は T_4 を表す。*in vitro* 実験で T_4 -ヒトBリンパ球及び上皮細胞 (これらの細胞はAIDSウィルスにとっての天然的ではなく、AIDSによる感染症に感受性にする) への作用を示す。

実験的1. 対象細工、フラグメント

細胞性 T_4 蛋白質フラグメントを細胞表面抗原ロテマー化を用いて測定する。代わりに、トラン・ドメイン (領域が中性及び環状性接着蛋白質) T_4 フラグメントをコードするDNA表現ベクターを用いて T_4 フラグメントを作るのに使用しても、

分離される。

実験例2：AIDS患者の治療

患者の血液及び他の体液中に存在するウィルスに結合して、in vivoでT₄フラグメントの感染をブロックするため、実験例1に記載した可溶性T₄タンパク質フラグメントは、典型的には医薬的に許容可能なキャリヤー内で、ヒト免疫不全症ウィルスに感染した患者に投与される。代わりに又は更に、ウィルスが血清から分離し得るよう、患者の麻痺は固定化で、in vivoでT₄タンパク質又は可溶性T₄フラグメントのいずれかを含むカラムを介して吸着される。そのような処置は免疫システムがウィルスに対してより効果的な免疫応答をすることを可能にする。即ち非活性T₄細胞を増殖させる。

可溶性T₄フラグメントは他選択的なもの、即ち使用するHIV抗体の細胞外及び細胞-細胞接觸の阻害剤として作用する。本申請人は、可溶性T₄フラグメントがin vitroでHIVがT₄受容体に対して結合、阻歿するのを阻害することを示した(実験例4参照)。可溶性T₄フラグメントのHIVに感染したヒトへの投与は、ウィルス感染の細胞外接觸を阻害する。更に、HIV-感染T₄細胞及び非感染T₄細胞を増殖させる。

トランスマンプレンセグメントの端では終じ、ヌクレオチド位置約1864で開始する(第6図)。この組み換えDNA分子はトランスマンプレンと細胞質ドメイン間を欠く。EcoRI-HpaIIフラグメント(ヌクレオチド1~1258を包含する)をP.T₄Bのより小さいフラグメントから構築することにより、複雑する。代わりに、スパンディング(spinning)のみを説明し、細胞質ドメインに結合したV₁とドメインを脱離する。1つのアプローチは、P.T₄B由来ヌクレオチド1852~1848からNpaII部位を抱きフラグメントを除去することである。このような構造物は、ラク小胞体/ゴルジ複合体に導入し、結果として細胞から分泌するに必要なT₄シグナル配列を露出する。さらに、これらの構造物は、タンパクの細胞外部分を維持し、ここでヒト免疫不全症ウィルスエンベロープタンパク質が存在する。

哺乳類で可溶性T₄フラグメントを発現するためには、終節したが、cDNAフラグメントが、長い直接生産プロモーター

細胞の融合(これはウィルスが拡散するルートである)

性T₄フラグメントの投与により阻害される。

總て、可溶性T₄フラグメントの投与は経気道投与。AIDSに伴ういくつかの症状を軽減し、新しい病変化の発生を抑ぐ。

生化学的に純粋で半導体試薬である可溶性T₄フラグメントは、T₄-HIV相互作用の結合体(complexes)を分離する試薬と組み合わせて使用する。HIVエンベロープタンパク又はHIVエンベロープタンパクを含有する生化学的試薬と組み合わせた可溶性T₄フラグメントを、ウィルス結合剤をスクリーリングするのに適用する。

実験例3：可溶性T₄フラグメントの製造

組合したT₄タンパク(ロツイB)をコードするDNAを解離し、活性化し、哺乳類細胞クイップの成長で培養する。可溶性T₄フラグメントはバクテリア、酵母、昆蟲、哺乳類の系で生成する。即ちT₄タンパクは複数に持っているため、哺乳類の系における発現が好ましい。即ちT₄フラグメントはV₁とドメインの次でP.T₄Bのドメインことにより発生する。このようなDNAフラグメント

ハンサーは、可溶性T₄cDNAフラグメントから上位する。SV40又は可溶性T₄cDNAフラグメントからのヒト成長ホルモン遺伝子のいずれかのポリアデニル化配列することにより、脱水終結及びRNAポリアデニル化する。当業者に公知の任意の方法により遮断マークーにこれら由エレメントを導入する複数個の座標生物への外因性RNAの安定な組み込みを導く。選択培地における成長能力により選択されると形質轉換法は、培養上清液へT₄フラグメントを分離する。可溶性T₄フラグメント1つ以上のアセイの内の1つ(例えば、ラジオイムノ拡散)により上清液中で検出し、精製する。可溶性T₄フラグメント及び活性化は細胞株を培養することにより著しく増殖する。これは分離したタンパクフラグメントを過剰過多にする。バクの黒斑過多にさせる方法が、バクテリア、酵母、昆蟲、哺乳類の系で使用された。もし構造的に発現したなら多くのタンパクを生産過多にするため、濃度可抑制濃度を高め

の酵素) の連続的に増す濃度の成長によりジヒドロ葉酸レダクターゼ (dhfr) 遺伝子の活性が広く用いられた。配列をコードするあたりに対し培養されたユニットは割離されないことで、このアプローチはそれらに隣接する配列の同時増殖 (coamplification) する結果になった。袋って、dhfr を選択的マークとして、及び新たに導入した配列を同時に増殖する手段として使用する。この方法は、dhfr プラスミドでコトランスクォーメーションされた種々の遺伝子の発現を増加するのに古くよく使用した。例の当橋又キームはプラスミド pDLA-T-3 と可溶性 T₄ cDNA 発現ベクターのニトランフェクション、次いで既に記載した過剰を使う (102)。

はって、可溶性 T₄ cDNA の複数産物は、dhfr 発現プラスミドとコトランスクォーメーションされる。これわりに、可溶性 T₄ cDNA フラグメントと同じプラスミド上に dhfr 遺伝子が存在し、リンクしたコトランスクウォーメーションを許す。これらの構成の dhfr -欠失 (dhfr⁻) チャイニーズハムスター腎臓 (CHO) 細胞へのトランスクォーメーション及びベクターセットにおける選択は、新たに導入した配列を表現する安定な形質転換体を分離せしむ。いくつかのクローニング

構造し、培養上清液を回収し、可溶性 T₄ フラグメントを分離する。可溶性 T₄ フラグメントの最大レベル、クローンはノーザンプロット及びサザンプロット分析に特徴化される。次いでこれらの細胞は、新たに導入したメトトロセキセートを含む過剰培地で培養される。この圧力は新たに導入した dhfr⁻ 遺伝子及び可溶性 T₄ とした。メトトロセキセート最大濃度に達した後、生産をノーザンプロット及びサザンプロット分析して、それを決定し、可溶性 T₄ フラグメントの存在についてそれを調べた。

培養上清液中の可溶性 T₄ フラグメントの特徴化のくつかの形質転換体を (³⁵S)-メチオニンで代謝的である。細胞溶解液 (lysate) 及び上清液を次いで可溶性 T₄ 粒体を沈降するラジオイムノ沈降法及びビニスター分析で分離する。 SDS-ポリアクリルアミドゲルを枕塩酸上で実施し、分別され、端を切った形の T₄ 分子量 (Mr) を観察する。脂質系で合成されたタンパクは適当にグリコシル化し、折り重なってオリヌクルフィドブリッジが形成する。培養上清液から可

フラグメントを確認するため、抗-T₄ 抗体を用いるイムノアフィニティーカラムクロマトグラフィーを実施する。カラムに結合したタンパクを高い精度及び低吸光度で検出する。N₁ 及び N₂ 及び清出したタンパクフラクションの純度を決定するため、抽出した物質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施する。アフィニティー標識した抗原をより簡便化するためには、ラジオアイソトピー標識した抗原を用いてもよい。更に、本明細書で記載したより小さいサイズのフラグメント (例えば V, J, D リンクのみを含むするような) を抽出してもよい。

〈以下余白〉

ベクターの構築

組換え DNA 技術を使用して、ヒト T₄ cDNA 複合 (p) 1-1852B, SV-10細胞プロセーターとカルボン過酸化のポリアガニル化領域に從属する tRNA との間に配置した。T₄ cDNA のこの配列は T₄ のリードー及び示された細胞外ドメインをコードする。この tRNA ミニ遺伝子をヒト H-ras 又はマウスジンリダクターゼと組合して、共ベクター pSST₄ CE pSST₄ DHFR を作製した。これらのベクターの作成のようを行った。

pSST₄ CE の構造

プラスミド pSST₄ CE を、他の 2 つのプラスミド pUC₁₈T₄ から構成した。これらのプラスミド以下に詳述する。

プラスミド JRT₄ の構造

プラスミド JRT₄ を作製するためには、プラスミド

領域(113)をB_{gl}I及びKpnIで切断し、KpnI部位をT₄cDNAによりメターリーで処理して非活性化した。この380bp断片をDSP1に結合してDSP1-BGKを作製した。DSP1-BGKはSmaI及びUstIで切断し(SV40初期プロモーター、2'IKコード領域及びBGK由来領域から成る)非活性カセット(cassette)を、SalI末端、B_{gl}I末端及びSmaI末端から成る合致シンカーを使用することにより、pUC18(10T)中のSalI部位に結合した。この3つの部分結合の結果、プラスミドpUC18-BZBCH-T₄が得られた。

DSP1-BZBCH-T₄をS14I及びB_{gl}Iで切断してSV40コード領域を欠失させたものを、プラスミドpT₄-B(70)由来T₄cDNAを含む1.7kbのP_{coR.I}(フィールドーイン)-BamH I断片に結合して、プラスミドpT₄を作製した。

プラスミドpUC-T₄の構造

プラスミドpUC-T₄を作製するため、プラスミドpT₄-B由来T₄cDNAのHaeII部位およびHpaII断片(112bp)を、XbaI及びXbaIで切断されたベクター-pUC18に合致シンカーを使用して結合した。T₄cDNAのHaeII末端をシンカーを使用して結合した。T₄cDNAのHaeII末端をKpnI末端及びHaeII末端をもつ合致シンカーを用いて

pUC18のKpnI部位に結合した。T₄cDNAのHpaII部位を、HpaII末端及びXbaI末端をもつ合致シンカーをpUC18のXbaI部位に結合した。このシンカー-T₄cDNAのタクレオチド1851の後のTAA停止コドンに接続されたプラスミドはpUC-T₄であった。

プラスミドpST₄-BZIを作製するため、プラスミドpT₄をB_{gl}I及びSacIで切断して(SV40初期プロモーターとT₄cDNAの最初の601個のスクレオチド)から成る680bp断片を単離した。プラスミドpUC-T₄をS14Iで切断して(合致シンカー由来TAACドンに接続された)M_{sp}638-1857由来するT₄cDNAから成る600bp断片を単離した。これらの2つの断片をBamH-XbaIで切断してSV40初期プロモーター及びフルレット₄コード領域を欠失させたDSP1-BZBCH-T₄とした。

pST₄-DHFRの構造

プラスミドpST₄-DHFRを作製するため、β-ンDHFR発現カセットを含む3'N-H-HaeIIをpST₄-salのBamH I部位に結合した。ターゲラビン

DHFR発現カセットは、マウスβ-グロビンプロモーター(B_{gl}I部位を含有させるために合致シンカーを用いて)プラスミドpK208(10S)の5'末端を導入した。次にプラスミド由来の160bp HaeII断片)、マウスDHFRコード領域(プラスミドpSV2-DHFR(10S)由来の1550bp Hind III(フィールドーイン)(111-11))、DSP1(10S)由来のNdeI(フィールドーイン)-BamH I(フィールドーイン) SV40オリゴA初期領域、及びマウスDHFR終止領域(BamH I部位を作製するためには合致シンカーを用いてプラスミドmDII-9(219)の3'末端を導入した)を組み合わせてpST₄-DHFRのプラスミドマップは図示のとおりである。

pST₄-cHrasの構造

プラスミドpSVX(111)をZ_{eoR.V}及びHind III(フィールドーイン)で切断してSalI領域を除去し、さらにプラスミドpSK-cHras(112)由来の、cHrasに接するコード領域を含

可溶性T₄活性カセットをB_{gl}I-BamH I断片を用いてpST₄-salから取り出し、pMGK-cHrasのBamH (SV40初期ボリAに対して3')中に結合してpST₄-cHrasを作製した。

細胞培養中の可溶性T₄(pST₄)と二重伝子の発現

NiH-3T3細胞中でpST₄-cHrasの発現10μgの脂質DNA(NiH-3T3TSゲノムDNA)、G418耐性を有するベクターであるプラスミドpT₄-10Sを用いて、リン酸カルシウム沈澱法により、プラスミドpST₄-cHras(10μg)をNiH-3T3細胞(前日、各四当たり5×10⁵細胞を接種した)上に沈澱させ、この細胞を次回DNAと一緒に射出で6時間インキュベーションした。DNA沈澱物を取り出し、新鮮な培地(DMEM完備のSerum^P(Collaborative Research Inc., Lexington, Massachusetts))を液面に加えた。16時間後、細胞をドレン処理し、うつる100 μl皿中に液を残し、次いで上記細胞

Grand Island, New York), 印に選択用の細胞 5×10^4 個/150mm²皿を播種した。11倍のクローニングにてがG418選択(500μg/ml)にて生じ得たが、次に該クローリーを構成タンパク質イムノブロット分析によりpZ1 (pZ1)に関してスクリーニングした。

最も高いレベルのpZ1 (約200pZ1/ng - 7 trillion同源性タンパク質)を表現したクローリーを、³⁵S-標識メチオニン及びレステインと一緒に1835回インキュベーションした。培養上清及び細胞液解剖を、T₄ (OKT₄-022(A)) 及び T₈ (OKT₈) リセプターに対して特異的なモノクローナル抗体、[35]タンパク質に対して特異的なポリクローナル抗体、又は非特異的マウスIgGを用いて免疫沈降させた。eT₄の下部されたサイズである約65kDaのタンパク質を、T₄リセプターに対するモノクローナル抗体の面方を用いて培養培地から特異的に分離させた。細胞液解剖中に、eT₄バンドは観察されなかった。期終どうり、pZ1を該細胞から沈降させたが、培養上清からは沈降しなかった。これに説く定義は、精製eT₄と比較して、これらの由比が、実施例2Dに記載のC410細胞を作用した場合よりも約100倍低い比較的低レベルのeT₄を

産生することを示している。

チャイニーズハムスター卵巣(C50)中でのPST

DHFRの発現:

DXB-11細胞、すなわちC50 FR分化C50の細胞を、10μgの細胞DNA (NIH-3H3ゲノムDNA) 在中、10-30μgのPST₄ DHFRを用いてリンゴム沈淀によりトランスフェクションし、1日後、600-10³細胞を播種した。この細胞をDNA人沈降法と一緒に6時間インキュベーションし、培地を取り除き、次いで培地 (FBS, 10% FBS, 100ユニット/mlペニシリンストレプトマイシン) を該細胞に添加した。16時間後、培養液を交換し、細胞をさらに24時間インキュベーションした。細胞をトリプシン処理し、3つの100μl皿中には残しオシド非含む培地 (ヒボキサンチン及びチミジンを各-12, 10%濃度FBS, 並びに100ユニット/mlペニシリンストレプトマイシン) 中で選択した。7-10日以内 (約300/皿) が現われた。各皿からロニーを逐一引き分けした後、24穴培養プレート中に 5×10^3 個及び 5×10^4 個細胞/ウェルを、又は 5×10^3 個細胞

を播種した。20nMメトトレオシート (mts) を含有するタクレオシド先端有る培地中で選択を開始する3日前に細胞を回収した。回収のウェル又はクローリーをeT₄表現にてて表面的にアッセイし、さらに増殖用に選択したクローリーを上記の密度で24穴培養プレート中に沈降した。培養後3日目に、タクレオシド非含有培地中の880μg/mlでの選択を開始した。この選択を8μl/ml及び30μl/mlでの選択に繰り返し使用した。この方法を用いて、致死 $3\mu\text{g}/\text{細胞}/24\text{時間}$ で可溶化T₄を表現する数個の細胞系を得た。

eT₄の精製:

PBS選択条件下、350μlローラーボトル中に拡散させた付着性細胞培養地から、血清非含むのコンディショニング培地 (CM) を回収した。集合的に、Mg²⁺及びCa²⁺を含まないリン酸鈉緩衝液水 (PBS) で細胞を2回洗浄し、並行培地 (ヒボキサンチン及びチミジンを含まないHax's FIZ, 10%ウシ胎児血清, 100ユニット/mlペニシリン及びストレプトマイ

シル-48時間後、この培地を取り除き、選択生育培地と次いで、3-5日以内に、血清非含む培地を医療し、1サイクルを2ヶ月以上の間、最初限に繰り返した。全ての培養分離によってCMを濾過させた。プロテクトPMSR (アエニルメチルスルヤニルフルオリド) となるように添加し、加压滅菌後に約CMを約10倍とした。この純化CMを2,000×gでの遠心分離によりヨコロテアーゼ粗骨粗アプロテニン (Sigma Chemical, Missouri) を純度5.5mg/mlとなるように添加した。アルを直後又は-70°Cでの保存後に加工した。

表記したCMサンプルを50mM MES (N-モルエタンスルチオ酸), pH8.0で2時に希釈し、9.4%アガロPMSF (μ -アミノフェニルメチルスルヤニル) [CalBicchieri-Rehberg, San Diego, California] し、56kDa MCB, pH8.0で平衡化した8-Sephadex

過疎的濃度勾配を用いて、このサンプルを抽出させた。約0.2M NaClで抽出したピークフラクションをアルルし、PAPMS F100 MNで処理した。αT₄を含むフラクションを SDS-PAGE及びイムノプロットアッセイによって確認した。4度に1時間放置した後、50mMピーストトリスプロパン[1,3-ビス[(トリス-(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]プロパン]、pH8.0に対して該サンプルを透析した。

このサンプルを100 μM PAPMS Fで処理した後、68mMピーストトリスプロパン(BTP)、pH9.0で中和化したC-Sepharose^R(第四級アミノエチル)カドム(Pharmacia)(5mlサンプル/ml-アル)に適用した。αT₄サンプルはQ-Sepharose^Rに結合せずに、非結合フラクション及びカラム洗浄液中に回収された。非結合サンプルをすぐにpH8.0に調節した。

最終ステップとして、50mMリン酸塩、0.15M NaCl、pH7.0で中和化した80%クロソSuparose^R(カラム(2.5×40cm)(Pharmacia)上でクロマトグラフィーを行った。カラムは3.0ml/分の流速で移動操作された。10mlずつ分画され、42分目のピークをバック操作により採取した。この方法によって、約3

PR/細胞/日を産生する細胞系に附し、全タンパク量あたり約1.0 mgの生成物が得られた。

αT₄の性質

物理的性質: 亜蛋白質組成は、カラーメテリックSDS-PAGE(ピシンコニニック酸、イリノイ州ロックフェア Pierce Chemical Co. 提供)を用いて決定した。絶対量的アミノ酸分析試薬で決定した。精製αT₄のアミノ酸組成はアミノ酸分析試薬により測定したが、実験結果の範囲内で当該分子の予想したシーケンスと一致した。最初の20残基については、そのシーケンスなど多岐りであったが、ただlys-lys-val-val-で終まるなどわち、成熟アミノ末端は予想したリード-クリッピングして+3の位置から始まっており、当該位置でリード-クリッピングエンドとはさうのがも、アミノ酸化で異なっていた。ミノ末端の位置は、マウスおよびシープCD4蛋白質においておいた末端とよく一致している。αT₄から1.4%は、シーケンシング上のエラー(第一の塗墨変化)換算操作中に出した天然突位のなどであると思われる。

イムノエピトープ: サノクローナル抗体のOKT₄及び

OKT₄Aは、T₄レマブターの糞糞表面エピトープを認識する(114)。これらの抗体は、イムノープロット分析において遠元 SDS-安健蛋白質に結合しないことから、タイミングなコンポーネーションで特異的である。次に記載するような免疫沈降を認うと、鷲紀両方の抗体は³⁵S-ラベル若葉上清からαT₄を特異的に検出せることが明らかにされている。

80mM硫酸亜鉛1つめたり1×10⁶個の細胞を含むするαT₄-生葉細胞の培養液を、1.5 mlのメチオニンとシステインを含まないがαT₄、110 μCi/mlの³⁵S-メチオニンと36 μCi/mlの³⁵S-システインを含むA12培地(カリフォルニア州コスタメサ市のI.C.N.Biomedicals, Inc.)において、16時間37℃でラベルした。培養培地(30 ml)各容容器の沈殿バッファー(C100mlのリン酸ナトリウムpH7.5、100mMのNaCl、0.1%NP-40、0.5%の脂肪酰合物乾燥ミルク)で透析し、35分間4℃で3mlのウサギIgGとともにインキュベートし、更に20分間4℃で83ml(光吸収)のプロテインAセファロー

Ortho Pharmaceuticals Corp. のP-920 氏から提供をマウスIgG(ベンシルパニア州 SilverhillのCooper Biomedical)、又はウサギのヒマウスIgG(Cooper Biomedical)と10分間4℃でインキュベートした。OKT₄A、OKT₄、マウスIgGおよびウサギIgGは、24ml(光吸収)のプロテインAセファローズとともに30分間4℃でインキュベートすることに混合させた。沈殿を濾いて、ビーズを2回500 mlの沈殿で洗浄し、その後N.P.-40と非脂防酰塗ミルク(1:200 ml)の沈殿バッファー(125mM Tris-HCl pH8.8、リセロール、1.1 M、β-メルカプトエタノール)にて洗浄し、10.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を分析した。同じような結果が、OKT₄、OKT₄C、OKT₄D、OKT₄E、OKT₄F等に特異的な他のHabsについても得られた。これらの中

HIVのT₄細胞への結合を阻止し用いるか否かを確かめたる。

前から述べた群製T₄をOKT₄もしくはコントロール抗体で包被したセファローズビーズに吸着させた。次いでこのビーズを³⁵S-ラメチガニンラベルHIVの卵白質と混合した。

T₄とOKT₄の結合体は120μgのエンベロープ蛋白質の量を吸着させる。T₄が存在しないか又はトランスフェクションしていないCRO細胞からのコントロール上清が存在する場合には、OKT₄ビーズで洗浄する。ウィルス性蛋白質は沈殿しない。これらの研究は、アリンバ等の表面に存在する他の細胞表面成分をもたないT₄がAIDSウィルスのエンベロープ蛋白質と化粧的に共通し得ることを示している。

サイトアルオニメントリーを使って、完全なHIVのE6180とT₄との相互作用によりHIVのウィルスのT₄細胞表面への結合が阻止されることが判った。T₄のC端M細胞をT₄が存在させるとHIVにさらした。ウィルス感染の

後、細胞を洗浄し、フルオレスセン特異試料IVを用い、フローサイトメトリーで分析した(第17図)。T₄が存在しないと、HIVはT₄C端細胞に結合する。HIVをT₄でブレインキュベートするとT₄細胞への結合は阻止される(第17図)。10μgの精製T₄は、ウィルス性蛋白質100ナノグラムを阻止するのに充分である。エンベロープ蛋白質が全性蛋白質の5%を含むなら、T₄ 3539120のモル比が5:1なるHIVのT₄細胞への結合を完全に阻止する。HIVによるT₄細胞の感染を阻止し用いるT₄調べた。フォトペマタルチニン和樹ヒトリンド味を用いたり又は存在させないHIV被覆材料の混液にさらし、洗浄し、そしてマイクロカラチャーマイクロスにさらした後4日、8日および12日目にイムノキシマートを用いて感染率の強度を決定した(47)。このように蛋白質の既出細胞表面の50%を遮蔽するのに必要な濃度を感染性ウィルス活力ID₅₀とした。T₄が存在しないウィルス被覆材料を用いて検査したID₅₀は約10⁵。しがしながら、精製した可溶性T₄各8マイクログラム

をさせると、感染性は約4.10³だけ10^{-1.3}のID₅₀に減少する(第18図)。このHIVによる感染後の減算は、感染の全コースに亘って認められる。非特異的な阻止又はT₄の表面に対するコントロールとして、ウィルスへの初期露出後8時間たってT₄を培養液に添加した。感染後18時間たってT₄に露出した感染性はID₅₀において1log阻止しか示さない。このことはおそらく初期感染の後ウィルス活性が阻害されたためである。このように、ウィルスをT₄とブレインキュベートした時にみられるウィルス感染性の4log減少は、ウィルス表面上でのT₄とE6180との特異的な結合によるものであると思われる。したがってこれらの因子はやはり細胞表面のT₄レセプターと相互作用することができない。1mlあたり10⁵個の感染性粒子をT₄の8マイクログラム/mlとブレインキュベートするときにも、4log阻止が認められた。10⁵個の感染性粒子/mlのウィルス調製物は、10³粒子/mlを含有すると計算される。仮に各粒子が1000のエンベロープ蛋白質

T₄と免疫細胞の表面およびT₄とHIVウィルスの表面のメカニズムに関する研究を促進させることができ。T₄ヘルパー細胞と抗原細胞(antigen-presenting)(B細胞およびマクロファージ)との相互作用の結果なくとも部分的には、T₄とクラスII MHC分子との結合があるものと思われる(188,189)。かなりの数の精製T₄ができるなら、T₄とクラスII MHC分子との間の物理的相互作用が測定可能であることができる。

T₄E6180と結合し得る能力およびT₄がHIVウィルス感染を阻止し得る能力は、T₄がAIDS疾患に有力な抗ウイルス剤であることを示している。

実験例4：可溶性V1V2V4同様性T-4フラグメントベクター経路

PST₊BBV1DHF及び精製プラスミドPST₊DHFをつくるため、プラスミドPST₊DHF(例3に記載)をEcoRIおよびXbaIで切断し、PST₊

ゲメントを単離した。EcoR I エンド、Kpn I サイト、Bbv I エンドをもつ合成リーンナーを使って、前記フラグメントを EcoR I / Xba I 切断の ST, DHFR に結合させた。このフラグメントは、上で単離した T-4 フラグメントにある Bbv I を指向的である。用られたプラスミドを pST, BBV 1DHR という。

OMPAST の構造：プラスミド KOMPAST を用いた
OMPA は、OMPAP の NcoI および SA 位点を内化し、
リソマーゼ活性を含む小さなペプチドを除去した。OMPA-
CS は、CE リボソーム結合シーケンスの 3' 末端で NdeI
サイトに挿入されている合成シーケンスをもつ PAST1
(Rosenberg et al., Heit., 1990, 101: 123(1993) ; 米国
特許第 4,578,355 号明細書) の融合体である。合成シーケンス
は、OMPA リーダーとそれに続くマルチリニアーサークル
シーケンスとである。合成シーケンスは質的に次のものである。

5' - T ATG AAA ACG ACA GGT ATC CCG ATT GCA GTG GCA CGG
 CCT GGT TTC CCT ACC GTC CCC CAG GCC CGC CCT TCA GTC GAC
 CTA GTT AAC TAA -3'

プラスチックパレット、を400ミリ×600ミリで切成し、

する。 λ k123/126 の λ Y_AI 本質を、 λ UCS19 (ヒト cDNA の 1193-1857bp を含み、T-4シセプター接着位点 TAA と終端コードンのアミノ酸 355-363 をコードする) の λ Y_AI-XbaI フラグメントに結合した。 λ EcoRI および λ XbaI 末端でフランクしたこのシークエンスを、 λ UCS19 がリシン化 (λ k123/129) の λ ScorI および λ XbaI 火焰で λ UCS19 に導入した。 λ k123/126 は実験的に次のものである。

S C D - 4 シートエンス [T - 4 ニクレオチド 126-18
+ U145 横並びフラグメントを単離した。このフラグメント
Nco I / S a II 切断 OMPA, GS に結合させて OMP
I. を露製した。

OMPAST₄ BbvIの構造：プラスミドOMPAST₄をNaeI/XbaIで切削した。この切端によって得られたT-領域を含む小さいフラグメントを除去した。プラスミドBbV1DHPRとXbaIで切削し、得られた3'オング各々、cDNAを取りメラーゼで平滑末端とした。二端cDNAを改めてXbaIで切削し、CT₄cDNAの末端115-185を含む1124bp端部フラグメントを抽出し、フラグメントをNaeI/XbaIのGMPFAST₄ブレーフに組合し、プラスミドOMPAST₄BbvIを構成。
puucG₂115の構造：プラスミドpuucS₁(183を含む、T-4cDNA [アミノ酸(-28)から(+18)を含む882bp フラグメント] からEcoRI-NheI フラグメントでNheIサイトで合成了リンクするBbV1/BbvIとNheIとHinfIに結合させた。BbV1/BbvIはT-4アミノ酸173-185:

⑨ U C 19に導入した。E_cR I / P_E2は実質的に次のもの
 B' E_cR I C_E2B_EG_EG_EB_ET_EC_EI_EP_E(E_cR I / P_E2)_E
 T_EC_EI_EP_E(E_cR I / P_E2)_E
S_T4161DHF.Rの構造：プラスミドはT_EC_EI_EP_E(E_cR I / P_E2)
 るだん、P_E = S_T4161 (T_E / P_E358 ~ 372 に組合)
 ノ故 - 25-103 & E_c-R_E2) のE_cR I - Xba I フラグ
 ドを、 λ T-4をヨー-FTとE_cR I - Xba I フラグ。
 代わりに、P_E T_E4 DHF.RのE_cR I & J_EとXba I
 合成を止む。

9-76138D DHFR の挿入：プラスミド T4 108DHFR
 るため、pUC ST4108 (アミノ酸 851-256 に組合した
 領-25から196 をコードする) の EcoRI - XbaI フラ
 トを、cDNA をコードする EcoRI - XbaI フラグ
 ドを、pUC ST4 DHFR の EcoRI および XbaI で
 代わりに、pUC ST4 DHFR の EcoRI および XbaI で
 切り替えた。

グしてから一日経過した後に、10 μ g のキナセラー-DNA (NIH-3T3細胞DNA) を存在させて、リン酸カルシウム沈降法により10~30μg のGST-T4188Dヨードをトランスフェリションした。沈殿物を6時間後を取り出し、10%透析槽を用いて各ウェルの培養液を含むガハイポキサンテン又はセミジンを含まないT2培地に置き換えた。コロニー（1つの皿あたり約100）が10日後に形成された。各皿のコロニーをプールし、拡張し、247ウェルの培養プレートに1ウェル当たり 5×10^4 回の細胞をシードした。これらの細胞を、オクレオシドを含まないが300μMのメトトレキセート (5μ M) を含む培地で成長させ、トランスフェリションしたd₄₁₈₈T2V1V2J4ミニ遺伝子の可能性ある管暢のために選択した。5nMのd₄₁₈₈T2で2週間後、石墨的に成長する細胞を明らかに認めた。欠失突異株 (deletion mutants) の発現を調べるために各ウェル又はコロニーを集めて分析し、更に増殖のために選択したものを上に記載したのと同じ方法で各ウェル培養プレートにシードした。高レベルのV1V2J4を発現する多数のサブポビュレーションを 5×10^4 のレベルを初期しながら成長させ、d₄₁₈₈T2単位とT4188 (V1V2-J4) ミニ遺伝子を並に検査させるため選択した。いくつかの細胞系

えた。サンプルを直接凍るか又は-10℃で貯蔵した後処方した。

ウエスターントロット公査 V 1 V 2 I 4 生殖細胞から
のならし液地を塗抹し、35% ナイアクリルアミド導電ゲルにかけた。蛋白質をニトロセルロース紙に移し、着色し、Gel 明確
にした。蛋白質をニトロセルロース紙に移し、着色し、Gel 1 週間
後、
T₁ - NS 1 錠合分子に対するポリクローナル抗血清で検出した。
この抗血清は、約 25 kDa で移動する V 1 V 2 I 4 タブレット
を特異的に認識する。これは、リードープロセシング後の V 1
V 2 I 4 コードシーケンスの予想されたサイズに相当する。
このタブレットの物理的な位置は明らかでない。これはドーリー
ンクしたグリコシレーションの差から生じたものとも思われる
。ただし、このグリコシレーションのための T-4 における
2つのコンセンサスシーケンスは V 1 V 2 I 4 に存在しない
からである。

免疫ニビトープ：モノクローナル抗体OKT-4及び、
OKT-4A, OKT-4B, OKT-4C, OKT-4D

をこのようにして説明した。これでは少なくとも約2.1/24bitsの並び欠失要異常を発見する。

31) 過去条件下に85%のローラーボトル中に拡張し
胞培養物から血清を含まないならし培地 (CM) を調
整的に細胞を、 Mg^{2+} と Ca^{2+} を含まないリン酸緩
衝液 (PBS) で2回洗浄し、成長培地 (ハイポホサソ
ミジンを含まない Hase's FBS, 10% ラム胎児血漿, 10
μg のベニシリン、ストレプトマイシン、および選択的
剤) を、白布と mix を用いて 1×17S (インヒビン
フェリント、セレニウム (Collaborative Research Inc.)
加えた同じ培地に置き換えた。24-48時間後若姫を取
選択的成長培地に移した。密室内含育培地を次いで3
日内に再び用い、このサイクルを無限に、すなわち 2
繰り返した。CM を 2000 g の速く分散にかけてされ
プロテアーゼ 因止剤 PMSF (アセニルメチルスルホ
オライド) を 0.5 mM に加え、圧力型フィルターで CM
微縮した。この濃縮 CM を 2000 g の速心分離にかけて
し、プロテアーゼ阻害剤であるアブロチニン (ミズー
ントルイス社の Sigma Chemical) を 5 μg/ml の最終

アセト酸において、達成された、 SDS 活性タンパク
 ない血清のコンピューター・ションに対して効果的である
 先既析出法を用いて ^{35}S -ラベル培養上清から、双方
 特異的に V 1 V 2 J 4 を示すことが明らかになっ
 V 1 V 2 J 4 を生成する細胞を 86mm の培养皿あたり
 細胞含有する培養液を、1.6 ml のメチオニン及びシス
 テイン、 1TS 及び $170 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の $[^{35}\text{S}]$ メチオニ
 $80 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の $[^{35}\text{S}]$ システイン (ICN Biomedicals
 $\text{loc. Costa Mesa, CA}$) を含む F 12 培地中、 37°C で 16
 ル培養した。透明容器 (100 ml) を毎量の芽出バッフ
 リン酸少トリウム PH7.5 (100 ml N a C O₃ 0.1% N a
 0.5% 酸酵母ドライミルク) で洗出し、3 回のウサ
 と共に 4 度で 15 分間インキュベートした。その後、90
 時間後 (Pharmacia) のグランパクタセファロースビーズ (Pharmacia
 Biochemicals) で 4 度にて 30 分間処理した。予め構成
 薬剤、各々ラムダの上記した OKT、抗体、セウス I

ウス1をGを、20μg（充填容量）のクンバクムセファロースビーズと共に4℃で30分間インキュベートして振出させた。振出ののち、ビーズを、100μgの折山バッファーで2回、300μlの折出バッファーからNP-40°及び無鉛削ドライミルクを含いた溶液で3回洗浄した。洗浄したビーズを26μgロサンブルバッファー（125mMトリス-HCl, pH8.3, 20%グリセリン、1.4Mβ-メルカプトエチノール）巾で3分間煮沸し、その上清を12.5% SDS-PAGEアクリルアミドゲル上で電気泳動により分離した。OKT4Aを含いて、モノクロニーカル抗体の各々は、SDSでラベルした溶壁上部からV1Y2J4を純粋的に分離させた。

HIV結合の結果

J
OKT4AによるV1Y2J4の認団は、V1Y2W4が
AIDSウイルスの感染細胞に対する結合を阻害するであろう
J
ということを示した。V1Y2J4を含むかまたはそれを
欠かすCMを最初のアッセイに使用した。V1Y2W4と
共にインキュベートし、T-4-CEMセルラインに対するウ
ィルスの結合は、McDoogalら、supra(1995)に記載のようにし
て、FITC結合-HIV抗体とのインキュベーションおこ
て、

SPAC S（フルオレセイン活性化セルソーター）分
子量化した。V1Y2J4を生産するセルラインに由
CMは帯状度依存的にHIV結合を阻害したが、兩種
(switched)非活性（DXB-11）細胞に由来するCM
の効果も見られなかった。

クンバクV1J4はCD40和凶中で周囲に発現した。
これらのや否実験において、明らかにこのクンバクには
は結合されなかった。他の組合え有機体で表面された
がOKT4Aに結合することを示す別の研究によると、
その細胞培養で発現されたV1J4はHIV結合を阻
らうと思われる。

実施例9：可溶性T₄断片抗体の調製

完全フロントアジュバントに1:1の容積で入れ
の精製可溶性T₄断片（上記のようにして調製）50μg
筋のSDS/cマウスの腋窩内に注射する。その後一月毎
フロントアジュバントと混合した可溶性T₄断片を
ブーストし、尾脂球を通して採取する。血清のイムノ
ン画分を表面アンモニウム沈澱により作成し、固定化
断片を用いるアフィニティーカロットグラフィーによ
て、

の抗-可溶性T₄断片抗体を調製する。

実施例10：可溶性T₄断片式一イディオタイプ抗体の調製

完全フロントアジュバントに入れた本発明の構成物-可溶性
T₄断片元体（上記のようにして調製）50μgを遮光子起癌が
同じで同属のマウスの腋窩内に注射し、不完全フロントア
ジュバントに入れた抗-可溶性T₄断片抗体を毎月ブーストする。
融合の4日前、3日前および2日前に、生理食塩水に入れ
モノクローナル50μgをマウスの腋窩内にブーストする。次に、
既に記載されており本発明が示る分析で公知の手段によって、
母細胞をP3X63 AG8.653非分泌性ミエローマ細胞と融合する。
2週間後、ハイブリドーマの上清の抗-可溶性T₄断片抗体に
対する結合能をラジオイムノアッセイによってスクリーニング
する。次いで、阳性のクローンについて、ヒト免疫不全ウイルス
エンベロープタンパクおよびAIDSウイルスに対して能
力する能力を検定する。また、「ワニステップ」法を用いて、
蛋白質アソシエーション試験を行って、可溶性T₄断片をマウス

T₄断片抗-イディオタイプ抗体に接して検定する。

下記の文献は開拓者中に引用されたものである：

REFERENCES

1. E.L. Reinherz et al., "Discrete Stages of Human Intrathymic Differentiation: Analysis of Normal Thymocytes and Leukemic Lymphoblasts of T Cell Lineage", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1688-1693 (1980).
2. E.L. Reinherz and G.Y. Schlossman, "The Differentiation and Function of Human T Lymphocytes", *Cell* 19: 821-827 (1980).
3. M.L. Blue et al., "Coexpression of T4 and T8 on Peripheral Blood T Cells Demonstrated by Two-color Fluorescence Flow Cytometry", *J. Immunol.* 131: 2201-2206 (1983).
4. R.G. Engleman et al., "Activation of Human T Lymphocyte Subsets: Helper and Suppressor/Cytotoxic T Cells Recognize and Respond to Distinct Histocompatibility Antigens", *J. Immunol.* 137: 2124-2129 (1981).
5. A.M. Krancey et al., "Long-term Human Cytolytic T-cell Lines Alloreactive to HLA-DR5 Antigen Are OKT4+", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1166-1169 (1982).
6. S.C. Neuer, B.P. Schlossman and E. Reinherz, "Clonal Analysis of Human Cytotoxic T Lymphocytes T4+ and T8+ Effector T Cells Recognize Products of Different Major Histocompatibility Complex Regions", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4315-4319 (1981).
7. L. Rogozinski et al., "The T4 Surface Antigen Is Involved in the Induction of Helper Function", *J. Immunol.* 133: 735-739 (1984).
8. L. Sveain, "Significance of Lyt Phenotypes: Lyt2 Antibodies Block Activities of T Cells that Recognize Class I Major Histocompatibility Complex Antigens Regardless of Their Function", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7101-7105 (1981).
9. U. Landegren et al., "Selective Inhibition of Human T Cell Cytotoxicity at Levels of Target Recognition or Initiation of Lysis by Monoclonal OKT2 and Leu-2a Antibodies", *J. Exp. Med.* 155: 1579-1584 (1982).
10. R.M. Klinkenfelz and R.C. Ocherty, "MHC-restricted cytotoxic T cells: Studies on the Biological Role of Polymorphic Major Tissue-plantation Antigens Determining T Cell Restriction, Specificity, Function, and Responsiveness", *Adv. Immunol.* 27: 52-177 (1977).
11. J. Kappeler et al., "The Major Histocompatibility Complex-Restricted Antigen Receptor on T Cells in Mice and Men: Identification of Conserved and Variable Peptides", *Cell* 25:
12. W.Z. Siedlins et al., "Possible Involve-ment of the OKT4 Molecule in T Cell Recognition of Class II HLA Antigens", *J. Exp. Med.* 165: 1076-1082 (1982).
13. D.R. Wilkes et al., "Evidence Implicat-ing Class II MHC Antigen Reactivity No Antibody GK 15 (Anti-LT7c) Blocks MHC Antigen-Specific Proliferation, of Lymphokines and Binding by Clonal Helper T Lymphocyte Lines", *J. Immunol.* 138: 2178-2183 (1982).
14. S.L. Sveain, "T Cell Subsets and the Function of MHC class", *Immunol. Rev.* 14: (1983).
15. Y. Thomas et al., "Functional Assay Between T Cell Subsets Defined by m Antibodies. IV. Induction of Suppression Within the OKT4+ Population", *J. E. Med.* 154: 489-497 (1981).
16. B.O. Engleman et al., "Antibodies to Structures that Distinguish Suppressive and Helper T Lymphocyte Subpopulations Block the Mixed Leukocyte Reaction", *J. Exp. Med.* 154: 193-198 (1981).
17. P. Marrack et al., "The Major Histocompatibility Complex-Restricted Antigen Receptor of T Cells", *J. Cell. Sci.* 103: 1071-1081 (1981).
18. P. Ravindran et al., "Isolation of cDNA Coding for the Human T Lymphocyte Leu-2 (T8) by Gene Transfer and cDNA Cloning", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7692 (1984).
19. D.R. Littman et al., "The Isolation Sequence of the Gene Encoding T8: A Defining Functional Classes of T Cells", *Cell* 40: 237-246 (1985).
20. V.P. Sukhatme et al., "The T Cell Differentiation Antigen Leu-2/T8 is Homologous to Immunoglobulin and T Cell Receptor Regions", *Cell* 40: 591-597 (1985).
21. S.M. Friedberg et al., "Or-kill: A Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Induced IL-2 in Rats", *J. Immunol.* 135: 925-940 (1982).
22. D.A. Thurley-Lawson, L. Chess and J. Minger, "Suppression of In Vitro Epstein-Barr Virus Infection: A New Role for Adult Cells", *J. Exp. Med.* 165: 493-508 (1982).
23. J.W. Sodding, "The Chronic Chloride K Coupling Antigens to Erythrocytes", *Cell* 25:
- 24.

26. N. Wigler et al., "Biochemical Transfer of Single-Copy Eucaryotic Genes Using Total Cellular DNA as Donor", *Cell* 11: 725-731 (1978).
27. N. Wigler et al., "Transfer of Purified Herpes-Virus Thymidine Kinase Gene to Cultured Mouse Cells", *Cell* 11: 223-232 (1977).
28. J.M. Chirgwin et al., "Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease", *Biochemistry* 18: 5294-5299 (1979).
29. R. Aviv and P. Leder, "Purification of Biologically Active Globin Messenger RNA by Chromatography on Oligothymidylic Acid-Cellulose", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408-1412 (1972).
30. T. Huyah, R.A. Young and R.W. Davis, "Construction and Screening cDNA Libraries in *gt10* and *gt11*", *DNA Cloning Techniques - A Practical Approach*, D.N. Glover, ed. (Oxford: IRL Press), in press.
31. T. Maniatis et al., "The Isolation of Structural Genes from Libraries of Eucaryotic RNA", *Cell* 15: 687-701 (1978).
32. K.M. Davis et al., "Cell-Type-Specific cDNA Probes and the Murine β Region: the Localization and Orientation of β 1 α 1", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 2154-2158 (1974).
33. C. Terheggen et al., "Further Structural Studies of the Heavy Chain of HLA Antigens and its Similarity to Immunoglobulins", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 4002-4006 (1974).
34. J.A. Heid, L.C. Morrison and J. Roth, "Binding of Insulin Receptors to Lectins: Evidence for Common Carbohydrate Determinants on Several Membrane Receptors", *Biochemistry* 20: 3385-3393 (1981).
35. U.R. Loewi, "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Baculovirus T4", *Nature* 227: 600-605 (1970).
36. R. Karn, R.C. Mulligan, and D. Baltimore, "Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retroviruses", *Cell* 33: 153-159 (1983).
37. F. Barre-Sinoussi et al., "Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)", *Science* 220: 868-871 (1983).
38. N.R. McDonald et al., "Cellular tropism of
39. T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. S. Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory) (1982).
40. P.W.J. Rigby et al., "Labeling of Nucleic Acid to High Specific Activity In Vitro by Nick Translation with DNA Polymerase", *J. Mol. Biol.* 113: 237-251 (1977).
41. J. Vieira and J. Messing, "The pUC: An M13mp7-Derived System for Insertion Genetics and Sequencing with Synthetic DNA Primes", *Gene* 19: 259-268 (1983).
42. F. Sanger, B. Nicklen and A. Coulson, "Sequencing with Chain-Terminating Compounds", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463 (1977).
43. R. Southern, "Detection of Specific DNA Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis", *J. Mol. Biol.* 29: 503-517 (1968).
44. G.H. Church and H. Gilbert, "Genomic Mapping", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2953 (1984).
45. R.H. Scheller et al., "A Family of G-Proteins and SLM, a Neuropeptide Elicits Stereotyped Pattern of Behavior in Cell", *Cell* 33: 797-810 (1983).
46. V. Chen, J. Dixit and J. Maniatis, "Cloning of Two Distinct Regulators Adjacent to the Human Beta-Interferon Virus (LIV)", *J. Immunol. Meth.* 76: (1983).
47. J.S. McDougal, et al., "Binding of HTLV/LAV to T4+ T cells by a complex 110K viral protein and the T4 molecule", *Lancet*, 362-363 (1984).
48. C.B. Kaiser, et al., "Standardized Ligand Binding Assays for Alpha-1-Antitrypsin Fluorescence and Related Techniques", W. Knapp, K. Holubar, Wick, eds. (Amsterdam:Elsevier/North Press) p. 139 (1978).
49. M.B. Wilson and P.K. McNamee, "Recent Developments in the periodate Method of Conjugating Enzymes to Proteins", In Enzyme Labeling and Related Techniques, W. Knapp, K. Holubar, Wick, eds. (Amsterdam:Elsevier/North Press) p. 228 (1978).
50. J. Porath, B. Axen, and S. Rydbeck, "Coupling of Proteins to Agar", *Nat* 1491-1493 (1967).
51. B.J. Potter, et al., "Detection and
52. N.R. McDonald et al., "Cellular tropism of

- Neutralization by patients' sera. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1884-1889 (1984).
54. A.C. Delgaiash, et al., The CD4 [T4] antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature 312, 763-766 (1984).
55. K. Papovic, et al., Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and Pre-AIDS. Science 234, 497-500 (1986).
56. K. Nagy, et al., Human T-cell leukaemia virus type II: induction of syncytia and inhibition by patients' sera. Int. J. Cancer 22, 322-328 (1983).
57. D.M. Neville and W. Grossman, Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in Chondroitin sulfate. Methods Enzymol. 22, 92-103 (1974).
58. A. Helenius, et al., On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21 cells. J. Cell. Biol. 64, 404-420 (1976).
59. R.D. Core and R.C. Mulligan, High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retroviruses with broad mammalian host range. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 6342-6345 (1975).
60. F.M. Alt, et al., "Probes for Specific Subtractive Hybridization: Analysis of Immuno-globulin Genes", in Genes and Gene Regulation. R. Axel, T. Maniatis, C.P. Fox, eds. (New York: Academic), pp. 407-419 (1979).
61. M. Kazak, "Comparison of Initiation Protein Synthesis In Prokaryotes, Eucaryotic Organelles". Microbiol. Rev. 47, 3-45.
62. L. Hood, M. Kronenberg and T. Munkapi, Cell Antigen Receptors and the Immuno-supergene Family", Cell 50, 225-229 (1987).
63. S. Tonegawa, "Somatic Generation of Diversity", Nature 302, 575-581 (1983).
64. J. Kyte and R.F. Doolittle, "A Simplified Method for Displaying the Hydrophilicity Characteristics of Proteins", J. Mol. Biol. 157, 105-112 (1982).
65. G. von Heijne, "Patterns of Amino Acid Signal-Sequence Cleavage Sites", Eur. J. Biochem. 121, 17-23 (1972).
66. R.L. Kabat, et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (Washington: U.S. Department of Health and Human Services), p. 282 (1983).
67. A.P. Williams, et al., "Cell Surface Proteins and the Origins of Family", Proceedings of the Sigtuna Symposium, L.C. Andersson, G.G. Carlberg,
68. L.H. Axelson and R.J. Poljak, "Three-Dimensional Structure of Immunoglobulins", Ann. Rev. Biochem. 48, 961-997 (1979).
69. P.Y. Chou and C.D. Fasman, "Empirical Predictions of Protein Conformation", Ann. Rev. Biochem. 47, 851-876 (1978).
70. P.J. Madden, et al., The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T-cell surface protein Tα: a new member of the immunoglobulin gene family. Cell 52, 93-104 (1988).
71. R.A. McOssy, A. Flowers and B.J. Davis, Direct implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters. SS-2, Can. Res. 28, 1121-1125 (1968).
72. G.O. Gey, W.D. Coffman and M.T. Rubick, Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res. 12, 754-765 (1952).
73. J. White, M. Kielian and A. Helenius, Membrane fusion proteins of enveloped viruses. Quart. Rev. Biophys. 15, 1-40 (1983).
74. X. Marsh, The entry of enveloped virus cells by endocytosis. Biochem. J. 21 (1984).
75. M. Kielian and A. Helenius, Entry of viruses. In the Togaviridae and Filoviridae. S. Schlesinger and M.J. Schlesinger, eds. (Plenum Publishing Corp.), pp. 1-19 (1986).
76. S. Dixit, and B. Poole, Fluorescence measurements of the intralysosomal living cells and the perturbation of various agents, Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 3327-3331 (1978).
77. P.R. Maxfield, Weak bases and ionophores can reversibly raise the pH of vesicles in cultured mouse fibroblasts. Cell. Biol. 91, 676-681 (1982).
78. A. Helenius, X. Marsh, and J. White, Penetration of Semliki Forest virus particles.

82. P.M. Snow, H. Van der Rijst and C. Terheggt, "Association Between the Human Thymic Differentiation Antigens T6 and T8", *Eur. J. Immunol.*, in press (1985).
83. P.M. Snow and C. Terheggt, "The T6 Antigen is a Multimeric Complex of Two Distinct Subunits on Human Thymocytes but Consists of Mono-multimeric Form on Peripheral Blood T Lymphocytes", *J. Biol. Chem.* **258**: 14673-14681 (1983).
84. C. Terheggt et al., "Biochemical Analysis of Human T Lymphocyte Differentiation Antigens T6 and T8", *Science* **202**: 520-521 (1983).
85. V.H. Hildemann, "Immunocompetence and Allogeneic Polymorphisms Among Invertebrates", *Transplantation* **27**: 1-9 (1979).
86. V.L. Scalford et al., "Protochordate Allore cognition is Controlled by a MHC-like Gene System", *Nature* **295**: 499-502 (1982).
87. T.Z. Lentz, et al., "In the acetylcholine receptor - rabies virus receptor?", *Science* **245**: 187-188 (1982).
88. J.B. Fingerroth, et al., Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the CD2 receptor CR2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 4510-4514 (1974).
89. P.Z. Tamburini, et al., The physiopathology of Friend leukaemia, *Leukemia Rev.* **1**: 117-129 (1978).
90. N.O. Dayhoff, W.C. Barker and C.T. Burn, Establishing homologies in protein sequences. In *Methods in Endocrinology: Enzyme Structure*. Part I, C.R.W. Hirs and G.M. Timashoff, eds. (New York: Academic Press), pp. 328-345 (1983).
91. Y. Yamagi, et al., A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains, *Nature* **308**: 149-152 (1984).
92. G.K. Sims, et al., Primary structure of human T-cell receptor - α -chain, *Nature* **312**: 771-773 (1984).
93. M. Saito, et al., A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes, *Nature* **312**: 36-40 (1984).
94. M. Saito, et al., Complete primary structure of the β chain and gene of the mouse major histocompatibility complex, *Proc. Natl. Acad. USA* **80**: 5520-5524 (1983).
95. M. Saito, et al., The gene encoding the T-cell surface protein T4 is located on human chromosome 17, *Nature* **312**: 36-40 (1984).
96. P.A. Chotis, et al., Role for the genes in determining disease(s) of Friend and Moloney murine leukaemias, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: (1983).
97. P.A. Chotis, et al., A 3' end fragile passing the transcriptional enhancer nondefective Friend Virus confers leukemogenicity on Moloney leukaemia, *Virology* **52**: 240-254 (1984).
98. A. Bostick, H.J. Thiesen and P. Chotis, Transcriptional enhancer with specificity for erythroid cells is located in the 3' noncoding repeat of the Friend murine virus, *EMBO J.* **5**: 1615-1623 (1986).
99. A.N. Barclay, et al., Immunoglobulin structures associated with variable surfaces, in press.
100. D.S. Piatr, G. Saito and N.E. Wolf, Modular Cloning Vector for the Human Eukaryotic Genes and Gene Regulator Genes, *Cell* **1**: 161-167 (1986).
101. G. Urlaub and L.A. Chasin, Isolation of mouse HeLa Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity, *Proc. Natl. Acad. USA* **77**: 4210-4224 (1980).
102. Gay, D. et al., *Nature* **321**: 626-629 (1986).
103. Stockman, B.D. et al., *Nature* **278**: 1187 (1979).
104. Yanisch-Perron, et al., *Gene* **11**: 103 (1983).
105. Berg, P., et al., *Mol. Cell. Biol.* (1983).
106. Subramani, et al., *Mol. Cell Biol.* (1983).
107. Prayna, et al., *Mol. Cell Biol.* (1984).
108. Schumperli, et al., *Proc. Natl. Acad. USA* **81**: 6670-6674 (1984).

115. McClure, et al., Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation 3: 345 (1983).
 116. Grinblat, et al., Cell 32: 403 (1983).
 117. Kim, et al., Cell 42: 129 (1985).
 118. Wigler, et al., PHAS USA 26: 1973 (1979).
 119. Copeland, et al., Cell 21: 993 (1979).
 120. Sottentau, et al., Science 231: 1120 (1986).
 121. Gorenstein, et al., Ann. Inst. Pasteur 138: 136 (1987).
 122. Gay, et al., Ann. Inst. Pasteur 138: 227 (1987).

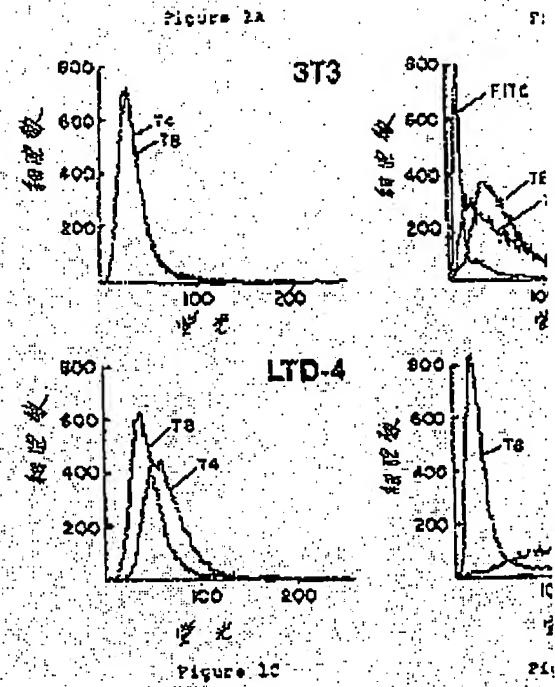


FIGURE 2

L fib.
LTD-4
M7
HeLa
H44R
SK-7
OT-1 AL
M-T fib.
M-T fib.
Thym.

FIG. 2.2

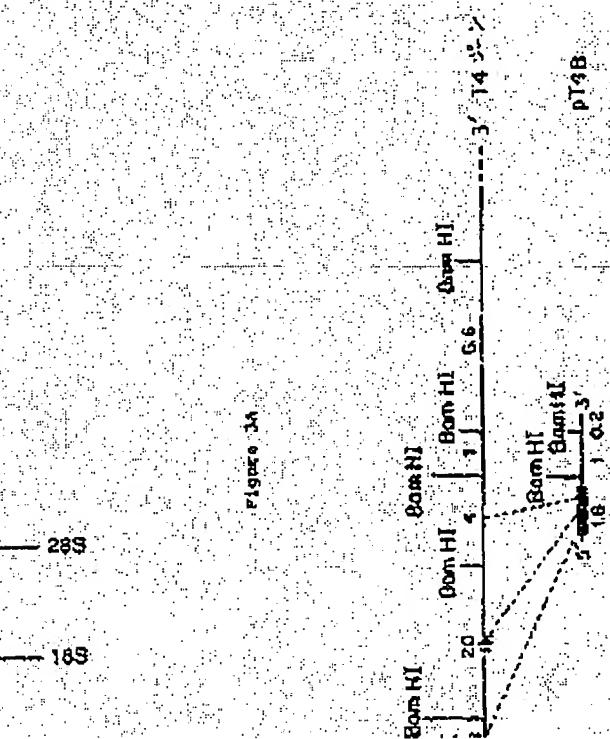


Figure 3C₁

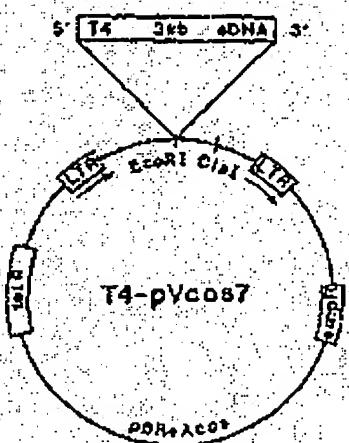


Figure 3B

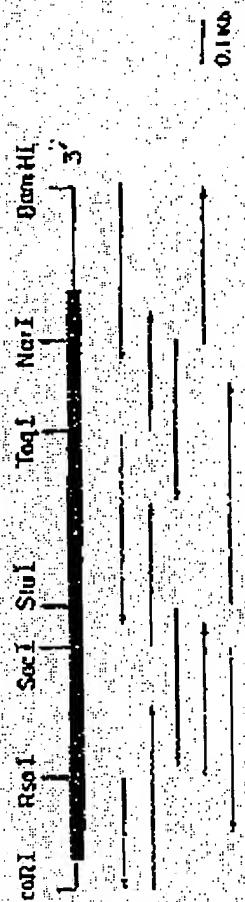


Figure 3C₂

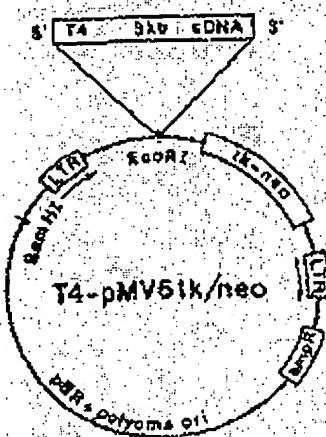


FIGURE 4

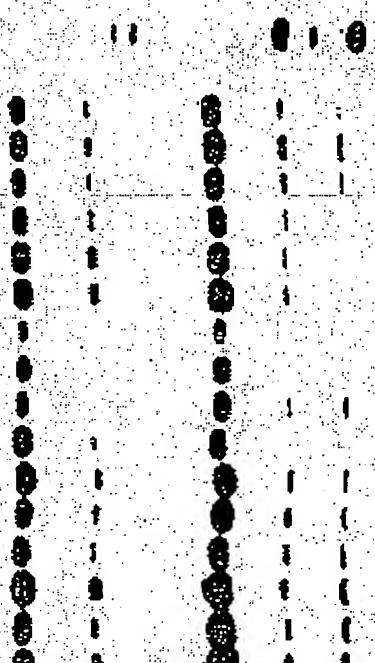


FIGURE 5

200 —
97.4 —
68 —
43 —
25.7 —

FIGURE 6A₂

-20
 tre ten arg gly val pro phe arg his leu leu
GCCGACGCCA ATG ANC CAA GCA CCC CCT TTT AGG CGC TTG CTT 103
 ← ↑
 410
 val Val leu gly lys lys gly asp thr val glu leu ser cys
GTC GCG CTG GTC AAA AAA GCG GAT AGA GTC GAA CTG AGC TGT 199
 ← ↑
 V1
 460
 cys ile lys ile leu gly ten glu gly ser his leu thr tyr
CAG ATA AAC ATT GTG CCA ATC CAG GCG TGT TIC TTA ACT AAA 280
 ← ↑
 510
 asp glu gly asp phe pro leu ile ile lys asn leu lys leu
GAC CAA GGA AAC TIC CCC CTG ATC ATC AGG AAC CTT AMG ATA TTA 379
 ← ↑
 560
 val glu leu leu val phe gly leu thr ala ser ser ser thr
GTC CAA TIC CCA GCG TIC GCA TGT ACT CCC AAC TCT CGC ACC 468
 ← ↑
 610
 gly asp ser pro met val glu cys arg met phe asp gly lys
GCT ACT ACC CCC GCA GTG CAA TGT AGG AGT GCA AGG GCG AAA 558

Figure 6A

EA ₁	E
6B ₁	E

Digitized by srujanika@gmail.com

+230
 Ile Thr Pro Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys
 ACC ACC TTT GAC CTG AAC AAG GAA CTC TCT GIA AAA C

 +260
 Leu Thr Leu Pro Glu Ala Leu Pro Glu Tyr Ala Gly Ser
 CTC CCT CGC CCC CAG GCG TTT CCT CAG TAC CCT GCG TCT G

 +290
 Val Asn Ile Val Val Met Arg Ala Thr Glu Leu Glu Lys
 CCT AAC CTG CCT GTC ATC AGA CCC ACT CAG GTC CAG AAA A

 +320
 Ile Lys Ile Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser Lys Arg
 TTG AAA CTC CGC AAC AAG GAG GCA AAC GTC TCC AAC CGC C

 +350
 Leu Ser Asp Ser Gly Glu Val Ile Leu Glu Ser Asn Ile
 CTC AGT GAC TCC CGA CGC GTC CTC GTC GAA TCC AAC ATC A

 +380
 Leu Gly Gly Val Ala Gly Ile Leu Leu Glu Ile Gly Ile
 CTC CGG CGC GTC CGC CGC CTC CGC GTC TCC AGT CGG CTA C

 TM

 +410
 Met Ser Glu Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Ile
 ATG TCT GAC ATC AAC AGA CTC GTC ACT CGC AAC AAC AGC T

Figure 63

+250
 gln asp pro lys leu glu met gly lys lvs leu pro leu his
CAG GAC CCT AAC CTC CGC AGG AGG AGG CTC GCG CTC CGC 9:8
 V3

+260
 thr leu ala leu glu ala lys thr gly lvs leu his gln glu
ACT CTG GCC CCT CAA GCG AAA ACA CCA AGG TGG CAT CAG GAA 10:8

+310
 cys glu val trp gly pro thr pro lys leu met leu asp
TCT GAC GTC TGC GCA CGG AAC TCC GGT AAC CTC AGG CTC TGC AGC 10:9B

+340
 val trp val leu asn pro glu ala gly met trp gln phe leu
GTC TCG GTC CGT AAC CCT GAG CGG CGG ATG TGG CGG TCG TCC CTC 11:8B

+370
 phe cys val arg cys arg his arg arg arg gln ala gln arg
CCC ACC TGG TCC AAC CGG CGA AGG CGG CGC ATT CGT ATT CGT 12:7B

+400
 phe cys val arg cys arg his arg arg arg gln ala gln arg
TTC TGT CTC AGG TGC CGG CGC CGA AGG CGG CGA CGC CGG 12:6B

+430
 pro his arg phe gln lys thr cys asp pro ile
CTT CAC CGG TGT CTC AGG AGA TGT AAC CGG ATT TGA CGCGCGA 13:5B

V7

ACATCAGCTTCAGAACCCGCGTCTGTTGGCTGTCTTCAATTTC 1573
GCTTCTTCATCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTT 1591

FIGURE 6.

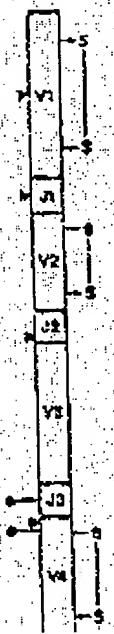


FIGURE 7

BP T4
92.5 —
66.2 —
45 —
31 —
21.5 —

Digitized by srujanika@gmail.com

T4	-	G N X V V - - -	G K X - G O T V E	10
4- κ appa	-	D V Q M I 0 6 7 6 6	[S A S L G O] Y R	
IVY		T		G
TB	-	S 0 F R V S P I D R T W H	[C I T V E	
YF35	-	D A G V I J Q 3 7 A H E V T E M I	[D E V T	
KPB-MTG	-	D Q Y T Q A Q T S L 3 Y V E X E D W T		
<hr/>				
T4	[S] [L]	- - - - -	N X R A D S 6 0	R
4- κ appa	[S] [I]	- D - - -	C V P C - R F S G S G	
IVY			G R Y G C S	
TB	Q N K P X A A B -	G L D T O R	F F G C Y R	
YF35	H H V P I I D -	S C R P E D	R F S A K M	
KPB-MTG	[S] P D E C G N E I S G - - -	R Y S W H T		

特許平2-50326

Figure 9A

30 40 50
K K - S I G P H V X X S N Q I K I C H Q A S Y T T X K P
Q - T S I N L H W P O Q K P G R A Y K - - - L I Y A
S N P T S G C S W L P O P R G A A A S P - - - P L L Y E S
Q - H H S L F W M Y R O T H M R G I S * - - - D I X Y H
R D T T Y Y L P M T K Q P P S C E L V - - - P L I R R A N
C C

74 J

KPB-MTQJ3

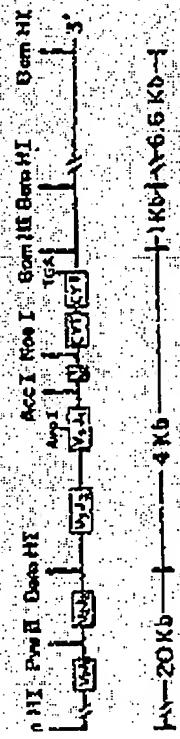
100
L V P G L - T A N S J O T H
L V P G E R G T R L T V L -
L V P G G G T K V F V L G
- T F G G G G 2 K L E I K A
E I F G S S T R L S I A -

30 40 50
P - P U I I K M L K I E D S P T Y I C E V E D O K E E - -
P - T L T T I G S H D D S D K H A T Y Y P C L Q H S Y I P Y - -
P - V L T I S D F R R K E Z C X Y Y P C S A L S H S I M - -
P - S T L K I O T S E P R D S A V Y Y P C A S S P S T C S A N
P - M P W I T A S Q V V D S A V Y Y P C A L O S S A G X - -
E F G

Figure 9C

300 350 400
T S V O P M A V I V C E V A C C I D P I C L G I C L P I Y P H
T S V O P M A V I V C E V A C C I D P I C L G I C L P I Y P H

Figure 10



物表2-51

Figure 11A₂

Figure 11A₁

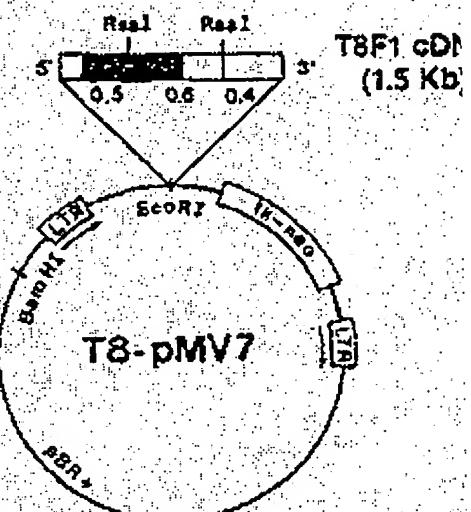
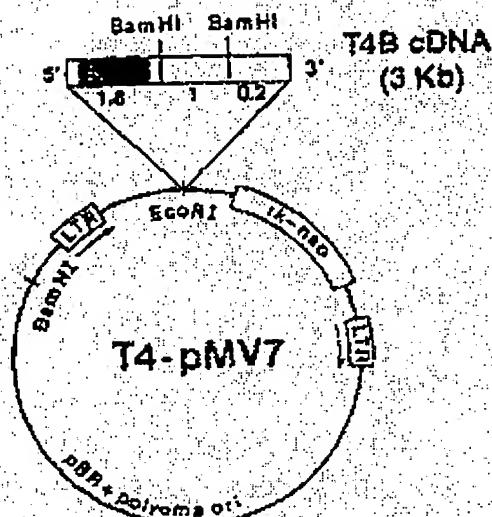


Figure 11B₂

Figure 11B₁

11B₁ 11B₂

10 µg T8-pMV7
(or T8-pMV7)
2.5 µg cDNA

T8⁺ (or T8⁻)
ψ2
クロ-ン

10 µg
上: 8%

5%
下: 10%

G418
セレクション

カゼトゲン
9734

フロニ-
用意

792ト933

足 T8⁺ (or T8⁻)
L-AM

L-AM

T8⁺ (or T8⁻)
L-AM

24-72252

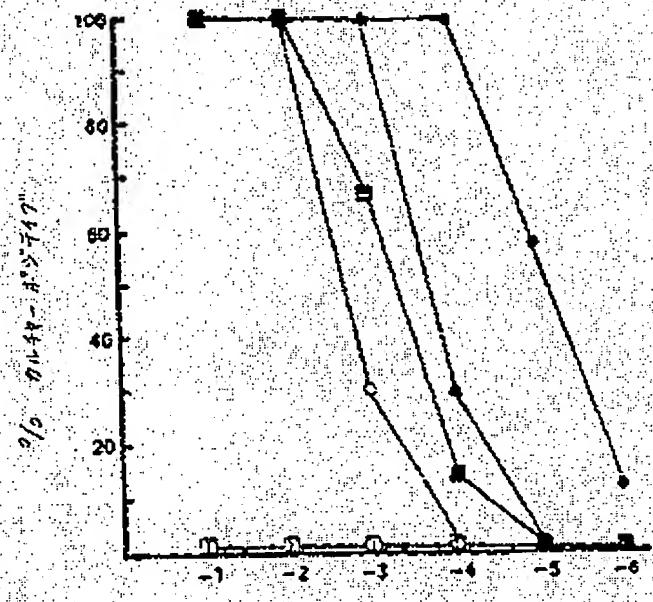
大津

G418

大津

4-1922
Nelsa

Figure 12

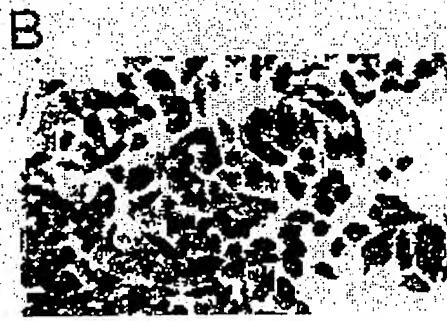


Log10 176142.82

FIGURE 13A



FIGURE 13B



cT4A or cT8

Figure 14A1



Figure 14A2

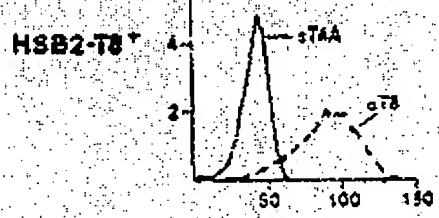


Figure 14A3

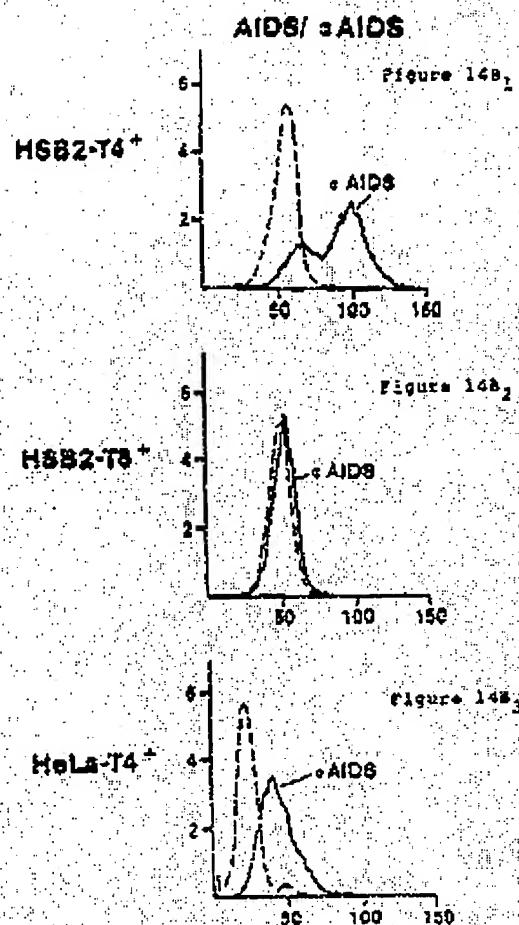


FIGURE 15A

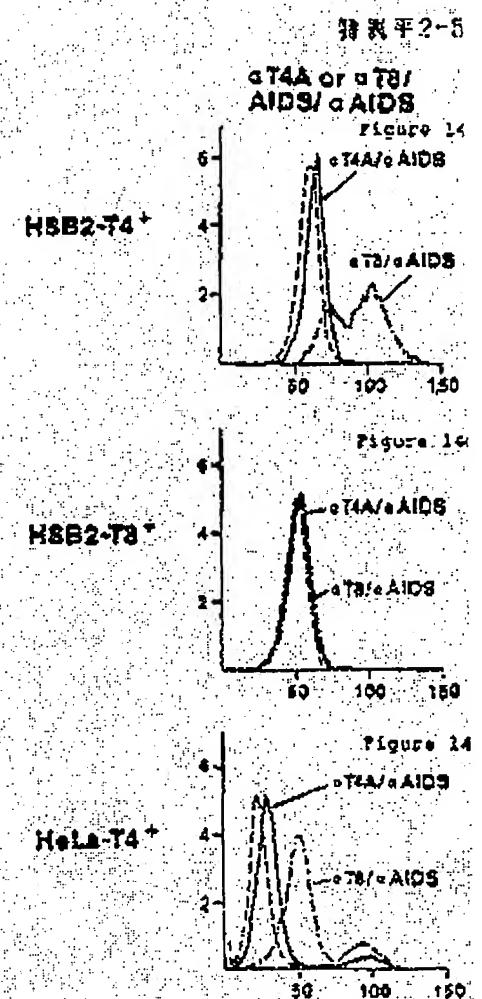


FIGURE 15B

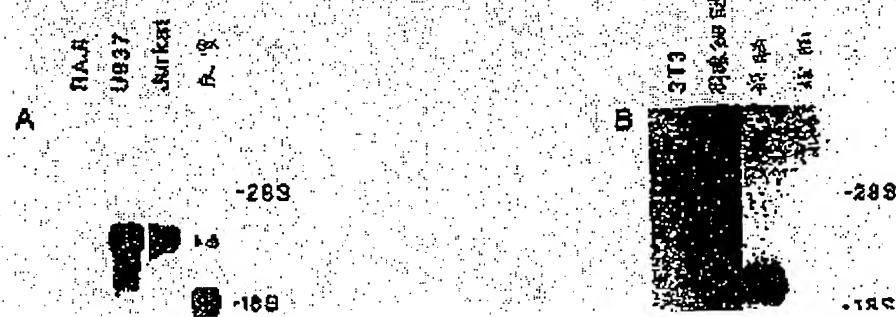
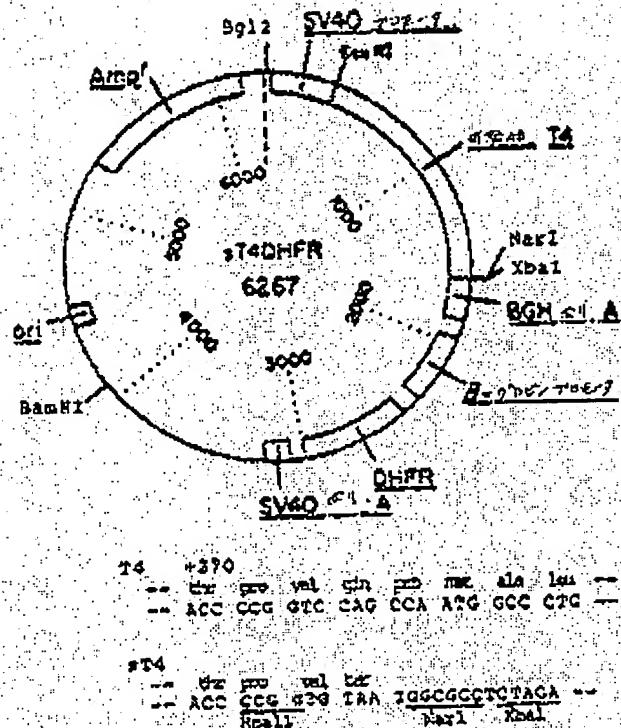


Figure 15



સ્ક્રિપ્ટ ૧૭

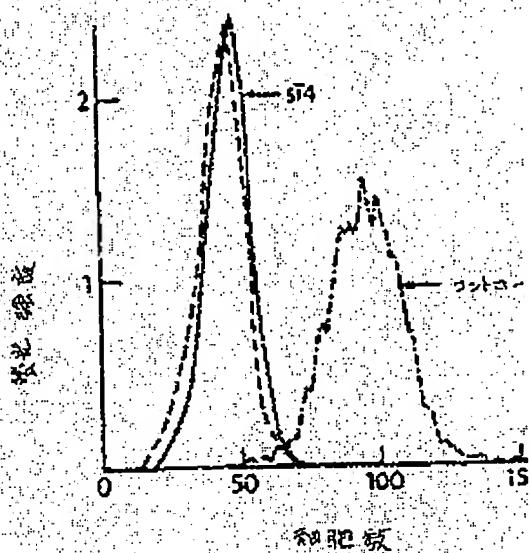


Figure 28A

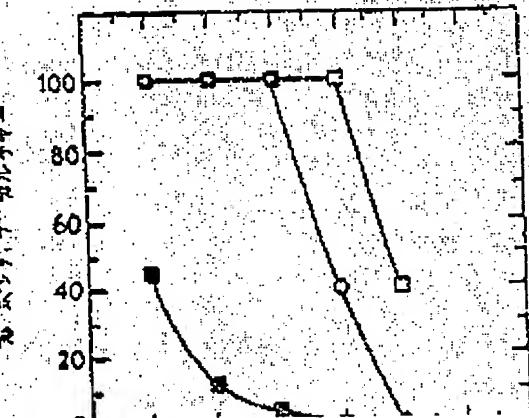
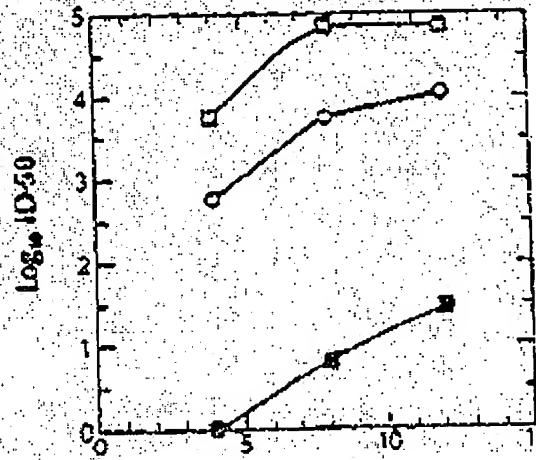


Figure 183

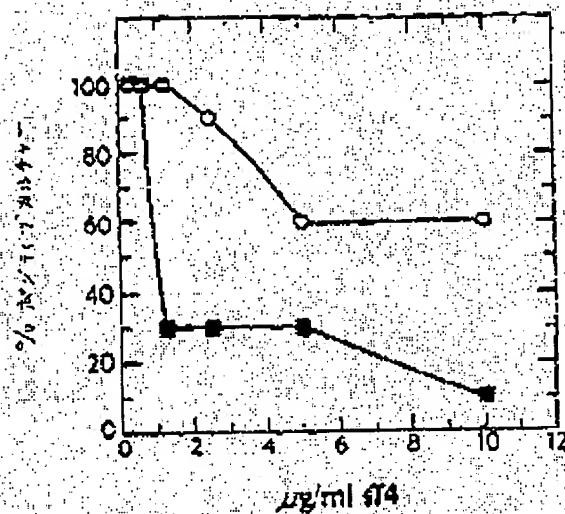


特表平2-50326

手 纟统 補 正 挑

甲戌元年

Figure 38C



1. 事件の表示 PCT/US 89/00762

2. 発明の名称 四層性TAの誘導体

3. 紹正をする者
事件との関係 特許出願人

名 称 ザ・トラスティーズ・オブ・コロシ
ユニヴァーシティ・イン・ザ・シテ
ニニー・ヨーク (ほか1名)

4. 代 表 人 東京都新宿区新宿 1丁目 1番14号
(郵便番号 160) 電話 (03) 334-1
(6200) 弁護士 川 口 錠
(ほか2名)

5. 紹正命令の日付 曲 允

6. 紹正により追加する発明の数 なし

7. 紹正の対象 明細書の翻訳文及び請求の範囲の翻訳文

8. 紹正の内容

(1) 鮮明な明細書の翻訳文及び鮮明な請求の範囲の翻訳文の添り補充する。

方式

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		SEARCHED	INDEXED	SERIALIZED	FILED
ACTIONS OF IMMUNE SYSTEM					
INT. CL. 4 - (52) 700; ARK 37(03) COTH 13/CO V.O. CL. 42-240; 220; 221; 222; 223; 224; 225; 226; 227					
E FIELDS MATCHED					
SEARCHED BY [unclear] DATE SEARCHED [unclear]					
EXAMINER'S SIGNATURE [unclear] DATE EXAMINED [unclear]					
SEARCHED FOR AND FOUND NO DOCUMENTS WHICH COULD BE RELATED TO THE INFORMATION DISCLOSED OR CONTAINED IN THE DOCUMENT					
RECORDED ON [unclear] DATE REC'D. [unclear]					
F. DOCUMENTS REFERRED TO OR RELEVANT					
SUBJECT		TITLE OR BRIEF DESCRIPTION OF DOCUMENT		SEARCHED	
X	Cell, vol. 42, issued August 1982; Mission, "The Isolation and Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding The T Cell Surface Protein Tsp-1 A New Member of The Immunoglobulin Gene Family," pp. 92-102; See entire document.			1-3 4-5 5-14	
X	ICBU (INTERNATIONAL COUNCIL OF SCIENTIFIC UNIONS) REPORTS, Vol. 2, Advances in Basic Technology: Molecular Biology of the Immune System, issued 1982, Lelerman, "The Isolation and Structure of the Genes Encoding The Human T Cell Molecules T4 and T8," pp. 223-234. See The entire article.			1-3	

U DOCUMENTS CONSIDERED TO BE ANSWER TO THE REQUEST FROM THE GACED DIRECTOR	
Category	Document Number, Date Received, Name of Author & Subject
U	Nature, Vol. 312, Issued December 1994. Delgrijns, "The CD4 + T4 antigen is an essential component of the receptor for the A103 retrovirus", pp. 760-766. See the entire document.
S	Cell, Vol. ED, Issued 31 September 1987. Lesley, "Identification of a Region in The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp 120 Glycoprotein Critical for Interaction with the CD4 Receptor", pp. 473-483. See entire article.

第1頁の報告

Int. Cl.
A 61 K 37/02
C 07 K 13/00
C 12 N 5/10
15/48
K C 12 P 21/02
C 12 B 1/21

識別記号 8815-4C
ADY 8619-4H
ZNA

明治 アクスル・リチャード

アメリカ合衆国、ニニー・マーク・10027、ニュー・ヨー
ーカイド・ドライブ:445

電気 明 著 スウイート・レイモンド・ダブ
リス

アメリカ合衆国、ペンシルベニア・19004、マラ・シン
エツジヒル・ロード・108

明 猪 アーソス・ジェイムズ

アメリカ合衆国、ミシガン・48104、アン・アーバ、ヒル
ート・2028

⑦出 瞳 人 スミスクライン・エクマン・コ
ーボレイシヨン

アメリカ合衆国、ペンシルベニア・19101、フィラデル
フランクリン・ブライア・!